

21740

1688/96

**KÖZZÉTÉTEL
PELDANY**

62.352/PA

75223

K I V O N A T

Eljárás kombinációs vegyület könyvtárak előállítására

CIBA-GEIGY AG, BÄZEL, SVÁJC

A bejelentés napja: 1994. 11. 28.

Elsőbbsége: 1993. 12. 09. (93810864.4),

NÉMETORSZÁG

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP94/03936

A nemzetközi közzététel száma: WO

A találmány tárgya eljárás számos különböző egység előállítására, amelyek tartalmaznak egy szilárd vagy félig szilárd hordozót (gyöngy), egy szintetikus oligomert (ligandum) és egy azonosító struktúrát (^{Chaine} tag), amely a ligandumok monomerjeit kódolja, valamint a találmány tárgyát képezi az említett könyvtár alkalmazása új vegyülettípusok és egyedi vegyületek keresésére. A találmány tárgyát képezik továbbá az új eljárással kimutatott vegyületek, valamint ezek alkalmazása trombin inhibítorként.

mel. a. m. &

95

1533/26

S.B.G. & K.

Nemzetközi

Szabadalmi Iroda

H-1062 Budapest, Andrássy út 113.

Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

62.352/PA

Eljárás kombinációs vegyület könyvtárak előállítására

CIBA-GEIGY AG, BÁZEL, SVÁJC

Feltalálók: FELDER, Eduard, BÁZEL,
RINK, Hans, RIEHEN,
SVÁJC

A bejelentés napja: 1994. 11. 28.

Elsőbbsége: 1993. 12. 09. (93810864.4), 1

NÉMETORSZÁG

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP94/03936

A nemzetközi közzététel száma: WO

A találmány tárgya eljárás számos különböző egység előállítására, amelyek tartalmaznak egy szilárd vagy félig szilárd hordozót (gyöngy), egy szintetikus oligomert (ligandum) és egy azonosító struktúrát (tag), amely a ligandumok monomerjeit kódolja, valamint a találmány tárgyát képezi az említett könyvtár alkalmazása új vegyülettípusok és egyedi vegyületek keresésére. A találmány tárgyát képezik továbbá az új eljárással kimutatott vegyületek, valamint ezek alkalmazása trombin inhibítorként.

Újabban egyre növekszik az igény olyan vegyületek iránt, amelyek szelektíven csak egy specifikus receptorhoz kötődnek. Ezeket a vegyületeket használhatjuk többek között inhibítorokként, agonistaként, antagonistaként vagy jelzésként. Ezzel összefüggésben kifejlesztették annak lehetőségét, hogy egyszerre szintetizáljanak számos különböző vegyületet (könyvtár), és vizsgálják, hogy képesek-e egy specifikus receptorhoz kötődni. Ezek a vegyületek (kombinatoriális kémiai könyvtárak=CCL) általában természetes aminosavakat vagy nukleotidokat tartalmaznak, illetve még gyakrabban tartalmaznak módosított aminosavakat, módosított nukleotidokat és egyéb vegyületeket, amelyeket monomer építőkövekként lehet használni.

Ezeknek a könyvtáraknak az egyes ligandumait általában egymással párhuzamosan szintetizálják, vagy keverék, vagy fizikailag egymástól elválasztott egyedi vegyületek formájában. Ez a párhuzamos szintézis teszi lehetővé, hogy olyan könyvtárakat állítsanak elő viszonylag rövid idő alatt, amely nagyszámú különböző ligandumot tartalmaz.

A szakirodalomban két lényegileg különböző fő stratégiát írnak le a több különböző vizsgálatra váró vegyületet tartalmazó könyvtárak kémiai szintézisére.

1. A ligandumokat a szintézis után oldatban kapjuk meg [Houghten és mtsai: Nature 354, 84-86 (1991)].

2. A ligandumokat egy szilárd hordozón szintetizálják, és a szintézist úgy szabályozzák, csak egy ligandumfajta kötődik a hordozóhoz [egy gyöngy - egy szekvencia: Lam és mtsai: Nature 354, 82-84 (1991); Furka és mtsai: 14th Intern. Congr. Biochem. FR013 (1988)].

Az első stratégiában a probléma az, hogy miként lehet a kívánt ligandumot világosan azonosítani, hiszen az összes ligandum egyszerre van jelen az oldatban. A különböző variábilis pozíciókkal rendelkező ligandumok azonosításához arra van szükség, hogy variációnként minden egyes lehetséges monomerből egy poolt szintetizáljunk, így például egy 4 variábilis pozícióval rendelkező ligandumnál, amelynél minden pozíciót a 20 aminosav egyike foglalhat el, $4 * 20$, azaz 80 poolt kell megszentetizálni és megvizsgálni.

A második stratégiával egyetlen poolban lehet előállítani az összes lehetséges variánst, és egyszerűen el lehet választani a kívánt ligandumot hordozó szilárd hordozót, ezzel azonosítani lehet a kívánt ligandumot. A korlátozás azonban a használt ligandum típusában található, mivel az összetételüket ezt követően kell azonosítani. Ennek megfelelően csak azok a ligandumok használhatók, amelyeket szekvenálással világosan azonosítani lehet (a természetes aminosavakat tartalmazó peptidek, DNS és

RNS). Egy további hátrány, hogy a ligandumoknak a szilárd hordozókhoz való kapcsolódása hamis pozitív eredményeket adhat, azaz számos vizsgálat nem végezhető el olyan ligandumokkal, amelyek szilárd hordozóhoz vannak kötve.

Ezekkel az ismert lehetőségekkel szemben a jelen találmány tárgya egy olyan könyvtár, amelyben minden egyes szilárd hordozóhoz csak egyetlen típusú ligandum kötődik (egy gyöngy, egy szekvencia), és csak egyetlen, ezt a ligandumot kódoló azonosító struktúra (tag) kötődik. Egy ligandumnak egy tag-hoz való világos hozzárendelése lehetővé teszi, hogy egy kötési vizsgálatban az olyan ligandumokat is azonosítsuk, amelyek abban a mennyiségben, amelyben jelen vannak a hordozón, nem azonosíthatók egyértelműen az ismert módszerekkel és/vagy automatizált eljárásokkal. Egy további meglepő előny, hogy a ligandum egy további eljárással leválasztható a hordozóról, anélkül hogy akár csak részben elveszítené az azonosíthatóságát, így a vizsgálat eredményét semmi esetre sem befolyásolja a szilárd hordozó. A homogén oldatban jelenlevő azonosított ligandumokkal tehát lehetséges olyan vizsgálatok elvégzése, amelyek nem végezhetők el a szilárd hordozóhoz kötődő ligandumokkal, ilyen például a további enzimatis vizsgálat, vagy tisztaságvizsgálat IR-rel, NMR-rel vagy MS-sel.

A találmány tárgya tehát egy számos különböző egységet tartalmazó könyvtár, amely egységek mind egy szilárd vagy félig szilárd hordozóból (gyöngy), egy szintetikus oligomerból (ligandum) és egy azonosító struktúrából állnak (tag), amely révén a ligandum monomerjei azonosíthatók, a következő jellemzőkkel:

(a) minden hordozó egység csak egyetlen típusú ligandumot hordoz,

b) a ligandum és a tag ugyanahhoz a hordozóhoz kötődik, különböző pozíciókban,

c) a ligandumot, függetlenül a tag-tól, és anélkül, hogy az információtartalmát megváltoztatnánk, leválaszthatjuk a hordozóról,

d) a tag egy szekvenálható polipeptid, és

e) a tag vagy a ligandum szintéziséhez egy védőcsoportot használunk, amelyet enyhe savas körülmények között el lehet távolítani.

Így tehát a találmány szerinti eljárással lehetséges két különböző vizsgálat végrehajtása:

a) egy első vizsgálat, amellyel előzetesen vizsgálni lehet az akceptorhoz kötött ligandumot, miközben az említett ligandum a szilárd vagy félig szilárd hordozóhoz kötődik,

b) egy második vizsgálat, a ligandumnak a hordozóról és az információs struktúráról való eltávolítása után, a ligandum további jellemzése céljából. A második vizsgálattal hasonlóképpen vizsgálhatjuk a ligandumnak az akceptorhoz való kötődését, de lehet egy teljesen eltérő vizsgálat is, amelyet nem lehet elvégezni a hozzákapcsolt ligandummal.

Az enyhe savas körülmények között eltávolítható védőcsoportokat teljesen eltávolíthatjuk például maximum 10%-os, előnyösen maximum 5%-os ecetsavval. Az előnyös védőcsoportok legalább tízszer labilisabbak mint a dimetil-dimetoxi-benziloxikarbonil védőcsoport (Ddz). Különösen előnyös csoport

például a tritil típusú, azaz például a helyettesítetlen vagy az alkoxi-helyettesített tritil csoport.

A ligandum szakkifejezés minden olyan vegyületre vonatkozik, amely számos különböző monomert tartalmaz. Tipikus esetben a monomerek legalább két reakcióképes csoportot tartalmaznak. Ilyen reakcióképes csoport lehet például az amino-, azido-, izocianido-, izocianato-, hidrazino-, karbonil-, karboxil-, acilhalogeno-, hidroxil-, szulfhidril-, szulfonil-klorid-, foszfát-csoport, valamint a halogén csoportok. A szintézis megkönnyítésére a csoportok reaktivitását módosíthatjuk, védő vagy aktiváló csoportok bevezetésével. A két vagy több reakcióképes csoportot tartalmazó monomerekre tipikus példa a természetes vagy nem-természetes aminosavak, ω -aminokarbonsavak, szacharidok, nukleotidok és nukleotid analógok. Ha kettőnél több reakcióképes csoportot tartalmazó monomert használunk, akkor az is lehetséges, hogy a ligandumba opcionális elágazásokat vagy ciklizációs lehetőséget építsünk be. A csak egy reakcióképes csoportot tartalmazó monomereket használhatjuk végcsoportokként.

Az alábbiakban részletesen ismertetett invenciózus eljárás azt is lehetővé teszi, hogy olyan ligandumokból készítsünk könyvtárat, amelyekben az egyes építőkövek nem csak egymás után vannak kapcsolva, hanem egymás mellé is, az alapvegyület egy specifikus kombinációjaként. Ezt úgy érhetjük el, hogy egy olyan alap építőkövet kapcsolunk a ligandumhoz, amely számos reakcióképes csoportot tartalmaz, vagy közvetlenül, vagy egy linkeren keresztül a hordozóhoz kapcsolva, majd ehhez az alap építőköhöz egyedi monomereket kapcsolunk, amelyek egy, vagy egynél

több reakcióképes csoportot tartalmaznak. A jelen találmány leírása során az alap építőkövek szakkifejezés jelentése szteroid mag, penicillin- vagy penem mag, szorafének, benzo-diazipinek, szacharidok vagy dezferoxiamin. A különböző reakcióképes csoportokat standard kémiai módszerekkel rögzíthetjük ezekhez a magokhoz.

Az előnyös ligandumok olyan monomereket tartalmaznak, amelyeket nem lehet világosan azonosítani szekvenálással, további kísérleti erőfeszítések nélkül, azaz például ismert automatizált eljárásokkal.

A szekvenálással világosan nem azonosítható monomerek mind kémiai vegyületek, kivéve a 20 természetes aminosavat és a DNS-ben valamint az RNS-ben előforduló természetes nukleotidokat. A tipikus példák a módosított aminosavak vagy nukleotidok, ω -aminokarbonsavak, D-aminosavak, szacharidok, szacharid oldalláncot tartalmazó aminosavak, valamint a csak egy reakcióképes csoportot, azaz például acetil- vagy benzilcsoportot tartalmazó végcsoportok.

A ligandumok általában szilárd vagy félig szilárd hordozóhoz vannak kötve egy linkeren keresztül. A ligandumhoz használt linkerek általában kémiai vegyületek, amelyek legalább két reakcióképes csoportot tartalmaznak. Azok az előnyben részesített linkerek, amelyek tolerálják a gyenge lúgos és gyenge savas körülményeket, így a ligandumok és a tag-ok nemcsak megszintetizálhatók, hanem vizsgálhatók is a hordozón. Az előnyben részesített linkerek tehát csak egy specifikus reakcióval hasíthatók le, ilyen például a metionin, amely brómcíánnal hasítható,

vagy ilyenek például azok a linkerek, amelyek csak erősen lúgos vagy savas körülmények között hasíthatók le, vagy fotolitikusan vagy redukáló illetve oxidáló körülmények között. Különösen előnyösek azok a linkerek, amelyek hasítható kötéseket képeznek lúgos közegben, de stabilak savas körülmények között, így a ligandum szelektíven eltávolítható a hordozóról. Megfelelő linker például a p-hidroximetil-benzoecet, a 4-hidroximetil-fenilacet, a benzhidrilamino-, az allil-, a hidroxikrotonilaminometil-csoport, a 3-nitro-4-hidroximetilbenzoecet, a p-nitro-benzhidrilamin, a 4-[4,4'-bisz(metilszulfonil)-2-oxibenzhidrilamino]-vajsav valamint a diszulfid linkerek, amelyek emellett egy olyan csoporton keresztül kapcsolódhatnak, amelyet a szilárd fázisú szintézisben handle-nek neveznek. Ezek a jelen találmány szerinti eljárásban alkalmazható linkerek tartalmazhatnak az ismertetett hasítható építőkövek mellett további építőköveket is, amelyek vagy befolyásolják a hasítási reakciót vagy nem, és amelyek alkalmasak arra, hogy a ligandum variábilis részét térbelileg elválasszák a hasítható csoporttól.

Az olyan rövid peptidek is használhatók linkerként, amelyek specifikus proteáz hasítási hellyel rendelkeznek, azaz például a tripszinnek, az ysc α -nak, az yscF-nek vagy a V8-proteáznak megfelelő hasítási hellyel.

Különösen előnyösek azok a linkerek, amelyeknek a hasítási helye ellenőrizhető, azaz megfelelő körülmények között a linkernek csak egy specifikus része hasad le, ezzel lehetővé teszi, hogy a ligandumokat több részben távolítsuk el a szilárd hordozóról, például további vizsgálatok miatt. Különösen azokat a

linkereket tekintik előnyösnek, amelyek illékony vagy gáz halmazállapotú ágenssel hasíthatók, azaz például ammóniával, mivel ezek a linkerek - a ligandumok vizsgálata előtt - teljesen, vagy majdnem maradékmentesen eltávolíthatók.

Ahhoz, hogy képesek legyünk arra, hogy a különböző ligandumokat pontosan meghatározott és - a ligandumok heterogenitása ellenére - egyenlő részletekben hasítsuk le, lehetséges, hogy a hordozó és ligandum egy hasítható részt tartalmazzon, amint azt az előzőkben jeleztük, valamint egy olyan részt, amely minden ligandumban azonos. A konstans rész megfelelő építőkövei általában lehetnek kémiai vegyületek, amelyek nemcsak a linker hasítható részéhez való kapcsolódást teszik lehetővé, hanem egyéb kémiai építőkövekhez is, vagy a ligandumhoz. Illusztratív példák lehetnek bifunkciós kémiai vegyületek, azaz például aminosavak, nukleinsavak vagy a ligandum invariábilis részei.

Az információs struktúra (tag) egy szekvenálható polipeptid, amelynek a kódoló egységei rendszerint természetes aminosavakat tartalmaznak (Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr és Val). Előnyös, ha olyan aminosavakat alkalmazunk, amelyeknek nincs reakcióképes oldalláncuk és/vagy könnyen azonosíthatók a szekvenálás során, ilyen általában az Ala, Asn, Asp, Gly, Ile, Leu, Phe, Pro, Trp és a Val. A tag emellett az egyik előzőkben ismertetett linkeren keresztül kapcsolódhat a hordozóhoz, amely linker specifikus körülmények között lehasítható. Ebben az összefüggésben lényeges, hogy a linker és a tag elválasztása lehetséges, függetlenül a másiktól, és a ligandumnak a hordozótól

való elválasztása nem módosítja a tag által hordozott információt.

Ha mind a 20 természetes aminosavat alkalmazzuk, akkor lehetséges, hogy 20 különböző monomert kódoljunk variábilis helyenként. Ha variábilis helyenként húsz különböző monomernél több monomert használunk, akkor minden egyes kódoló egységhez egynél több aminosavat használunk. Dipeptidek alkalmazásával lehetséges 20^2 különböző monomer alkalmazása 20 különböző aminosavval.

Ahhoz, hogy elkerüljük a helytelen értelmezést a tag szekvenálása során, ahhoz az szükséges, hogy csak az előzőekben ismertetett, előnyben részesített aminosavakat használjuk. Azután ezek az aminosavak használhatók di- vagy tripeptidekben, hogy növeljük a kódolható monomerek számát, azaz a ligandumnak minden egyes monomerét egynél több aminosav kódolja a tag-ban.

Ahhoz, hogy biztosítsuk, hogy a tag a lehető legkisebb mértékben befolyásolja a vizsgálat eredményeit, és a ligandum mennyisége a lehető legtöbb legyen, ahhoz az kell, hogy a ligandum-tag arány egy szilárd vagy félig szilárd hordozón előnyösen egynél nagyobb legyen, előnyösen 2 és 100 között, legelőnyösebben 4 és 10 között legyen.

Gyakorlati okokból a tag-ot elláthatjuk egy induló és/vagy lezáró szekvenciával, amely nem kódolja a ligandum monomerjét, így, ha a tag-ot szekvenáljuk, akkor lehetséges, hogy pontosan azonosítsuk a ligandum kódoló rész kezdetét és végét. Az ilyen induló és lezáró szekvenciák lehetnek például olyan aminosavak, amelyek nem kódolják a ligandum monomerjét, valamint azonos

aminosavakból álló di- és tripeptidek, azaz például a Val-Val vagy a Leu-Leu-Leu.

A "szilárd vagy félig szilárd hordozó" szakkifejezés jelentése olyan makroszkopikus részecske, amely nem oldódik a reakcióközegben és amelyhez mind a ligandum mind a tag elegendő mennyiségben hozzáköthető. A hordozóhoz köthető tag mennyiségének elegendőnek kell lennie ahhoz, pontosan azonosítható jelet adjon (azaz $> \text{pmol}$) ha a tag-ot szekvenáljuk. Ha a tag radioaktív izotóppal jelzett monomereket tartalmaz, akkor 1 pmol -nál kisebb mennyiségű tag hordozó azonosítható a radioaktív vegyületek kisebb kimutathatósági határa miatt.

A ligandum és a tag kötődését a hordozó felszínén levő reakcióképes csoportok révén valósítjuk meg, azaz például amino-, karboxil-, hidroxil- vagy halogén-csoportokkal. Ezek a reakcióképes csoportok általában már a hordozó alkotóelemei, de bevezethetők vagy módosíthatók később is. A szilárd fázisú szintézisben szokásosan alkalmazott gyanták lehetnek például a Merrifield féle peptidszintézisben használt gyanták. Ezek nagyrészt polisztirol molekulát tartalmaznak, amely divinilbenzol kopolimerizáció révén tartalmaz keresztkötéseket. A molekulákból további származékokat készíthetünk, úgy, hogy a reakciópartnereket a szilárd fázisú szintézisben összekapcsoljuk.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás az előzőekben ismerttetett könyvtár készítésére, azzal jellemezve, hogy a ligandumot és a tag-ot ortogonális és alternáló szintézissel kapcsoljuk össze.

A jelen találmány szerinti könyvtárak szintézise az alábbi lépésekből áll:

a) a tag első egységét (előnyösen ekvivalens mennyiségnél kisebb mennyiségben, azaz a hordozón levő reakcióképes csoportok alapján számítva 50 mol%-nál kisebb mennyiségben) kapcsoljuk, majd a ligandum vagy az építőkövének első monomerjét, vagy ezeknek egy linkerét a szilárd vagy félig szilárd hordozóhoz kapcsoljuk;

b) adott esetben további nem-variábilis monomereket kapcsolunk a ligandumhoz, vagy további nem-variábilis kódoló egységeket kapcsolunk a tag-hoz;

c) a szilárd vagy félig szilárd hordozót a ligandum variábilis monomerei szerint részekre osztjuk szét;

d) minden egyes részen külön, a kódoló szekvenciában további módosításokat végzünk a ligandumnál, vagy a ligandumnak ebben a pozíciójában lehetséges variábilis monomerek közül egyet kapcsolunk, valamint kapcsoljuk az ezt a lépést kódoló tag-ot;

e) összekeverjük a részeket;

f) a b) és e) lépéseket addig ismételjük, ameddig a ligandum variábilis részét teljesen megszintetizáljuk, majd

g) adott esetben egy vagy több további invariábilis monomert kapcsolunk a ligandumhoz vagy további nem-kódoló egységet kapcsolunk a tag-hoz (lásd az 1-es és 2-es reakciósémákat);

a tag vagy a ligandum szintéziséhez egy olyan védőcsoportot használva, amely enyhe savas körülmények között eltávolítható.

A tag első egysége kötésének, az első monomer ligandumhoz való kötésének és a linker első monomerhez való kötésének a

típusa függ a választott reakciócsoport típusától, és az ilyen csoportokra kidolgozott standard módszerekkel lehet létrehozni.

A további szintézist a szilárd fázisú szintézisre kidolgozott, ismert standard módszerekkel lehet elvégezni [Fields és mtsai: Intern. J. Pept. Prot. Res. 35, 161-214 (1990)]. A ligandum és a tag szintézisében használt átmeneti védőcsoportok (védő végcsoportok, amelyeket minden egyes szintézislépés előtt el lehet távolítani) ortogonális védőcsoportok, azaz a ligandum és a tag szintézisét egymástól függetlenül el lehet végezni. Például két védőcsoport csoport használható, az első csoport enyhe savas körülmények között távolítható el, a másik csoport pedig lúgos körülmények között távolítható el, vagy fény hatására, oxidatív vagy redukzív körülmények között. Különösen előnyös az olyan védőcsoportok kombinációjának alkalmazása, amelyek enyhe savas körülmények között és lúgos körülmények között távolíthatók el.

Hogy biztosítsuk a kompatibilitást a nagyszámú védőcsoporttal, amelyek a ligandum szintézise során megmaradnak, a savval eltávolítható ideiglenes védőcsoportok különösen kifejezett savérzékenységgel rendelkeznek. A megfelelő savra érzékeny védőcsoportok legalább tízszer érzékenyebbek mint a dimetil-dimetoxibenziloxikarbonil védőcsoport (Ddz).

A teljes ortogonalitás eléréséhez előnyösen a lúggal eltávolítható fluorenilmtoxikarbonil (Fmoc) csoportot használjuk a struktúra szintéziséhez, és savra érzékeny tritil (Trt) vagy helyettesített tritil védőcsoportokat, azaz például alkoxi-

helyettesített tritilcsoportot használunk a másik struktúra szintéziséhez.

A védőcsoportok kombinációjára az alábbi példákat adjuk meg:

<u>Ligandum</u>	<u>Tag</u>	<u>A monomerek oldallánca</u>
Fmoc típus	Trt típus	savra érzékeny vagy allil típus
Trt típus	Fmoc típus	savra érzékeny vagy allil típus
alliloxikarbonil	Trt típus	savra érzékeny
Trt típus	Boc vagy NPS típus	allil típus
Boc vagy NPS típus	Trt típus	allil típus
alliloxikarbonil	Trt típus	β -eliminációs típus
Trt típus	alliloxi-karbonil	β -eliminációs típus

A β -eliminációs típusú csoportok általában fluorenilmetil típusú védőcsoportok; az NPS jelentése nitrofenilszulfenil típus. A választható csoportok általános leírását Fields és munkatársai adják meg [Fields és mtsai: Intern. J. Pept. Prot. Res. 35, 161-214 (1990)].

Azok is alkalmas kombinációk, ha a fenti védőcsoport csoportok egyikét olyan védőcsoporttal rendelkező ligandumokkal vagy tag-okkal kombináljuk, amelyek fotolízissel eltávolíthatók, azaz ilyen például a nitrobenzil- vagy a nitroveratrilo-oxikarbonil csoport.

Az amidok szintéziséhez szükséges reakciólépések széles körben ismertek a szakterületen, és általában a reakcióban résztvevő karbonsav csoport aktiválásának típusától függenek. A reakciók általában egy kondenzáló ágens jelenlétében mennek, vagy, ha a karbonsavakat anhidridek formájában aktiváljuk, akkor a karbonsavat megkötő ágens jelenlétében. Néhány esetben az is lehetséges, hogy kaotróp ágenseket, azaz például LiF-ot adjunk a reakcióelegyhez NB-metilpirrolidonban. A reakciókat $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $+150\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérséklettartományban hajtjuk végre, előnyösen $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $+70\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérséklettartományban, és legelőnyösebben $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti hőmérséklettartományban, valamint ha szükséges, akkor semleges gázatmoszférában.

A jól használható kondenzáló ágensekre illusztratív példák a karbodiimidek, azaz például az N,N'-dietil-, az N,N'-diizopropil-, az N,N'-diciklohexil- vagy az N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid; a karbonil vegyületek, azaz például a karbonil-diimidazol; az 1,2-oxazólium vegyületek, azaz például a 2-etil-5-fenil-1,2-oxazólium-3'-szulfonát és a 2-terc-butil-5-metiloxazólium-perklorát; az acilamino vegyületek, azaz például a 2-etoxi-1-etoxikarbonil-1,2-dihidrokinolin; és az uronium vegyületek, azaz például a 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-tetrafluoroborát (TBTU); vagy a foszfónium vegyü-

letek, azaz például a benzotriazol-1-iloxi-trisz(dimetilamino)foszfónium-hexafluorofoszfát (BOP) vagy a benzotriazol-1-iloxi-pirrolidinofoszfónium-hexafluorofoszfát (PyBOP).

A használható savkötők általában alkálifémek, karbonátok vagy bikarbonátok, azaz például nátrium- vagy kálium-karbonát vagy bikarbonát (általában szulfáttal együtt), vagy szerves bázisok, azaz például sztérikusan gátolt tri-(alacsony szénatom-számú) alkilaminok, azaz például az N-diizopropil-N-etilamin.

A ligandumnak és a tag-nak a reakciókban részt nem vevő reaktív oldalláncait egy harmadik csoportba tartozó védőcsoporttal lehet megvédeni. A jól használható védőcsoportokat és a bejuttatásukra valamint eltávolításukra kidolgozott eljárásokat több helyen publikálták ["Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London, New York (1973); "Methoden der Organischen Chemie", Houben-Weyl, 4. kiadás, 15/1, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart (1974); Th. W. Greene "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, New York (1981); Atherton és mtsai: "Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach" IRL Press Oxford University (1984); Jones: "The chemical synthesis of peptides", Oxford Science Publications, Clarendon Press Oxford (1991); Bodanszky: "Peptide Chemistry" Springer Verlag Berlin (1988)].

A hidroxil védőcsoportokra tipikus példák az acilgyökök, azaz például a terc-butoxikarbonil gyök, az éterező csoportok, azaz például a terc-butil csoport, valamint a szilil vagy ón gyökök, azaz például a tri-n-butil-ón gyök vagy a terc-butildimetilszilil gyök.

A karboxilcsoportokat terc-butil-, benzil-, trimetilszilil- etil- vagy 2-trifenilszilil típusú észterképzéssel védhetjük meg.

Az aminocsoportokat kényelmesen megvédhetjük eltávolítható acilamino-, arilmetilamino, észterezett merkaptó-amino-, 2-acil-alk-1-enilamino-, szililamino-, ón-amino- vagy azidocsoportokkal, beleértve a terc-butoxikarbonil-, alliloxikarbonil-, benziloxikarbonil-, 4-nitrobenziloxikarbonil-, dimetilmetoxikarbonil-, nitrofenilszulfenil-, 2,2,2-triklóretoxikarbonil-, pentametilkromanoszulfonil- (PMC) vagy metoxitrimetilbenzilszulfonil (Mtr) védőcsoportokat.

A tiolok acetamidometil csoportokkal védhetők meg.

Ezeket a védőcsoportokat általában a ligandum és a tag teljes szintézise után közösen távolítjuk el a peptidkémia szokványos módszereit alkalmazva, általában 95%-os trifluorecetsavas kezelést alkalmazva. Néhány esetben erős nukleofilek, azaz például 1,2-etánditiol is hozzáadható, a keletkezett védőcsoportok befogására.

Ezeknek a védőcsoportoknak az eltávolítására további módszerek ismertek, ide tartozik, többek között a β -elimináció, szolvólízis, hidrolízis, alkoholízis, acidolízis, lúggal való kezelés vagy redukció.

A d) pontban ismertetett reakciókban a részek száma minden esetben megegyezik a kapcsolandó ligandum következő monomerje lehetőségeinek számával. Amint az előzőkben ismertettük, egy tag egység egynél több aminosavat tartalmazhat. Ha egy egység több aminosavat tartalmaz, akkor ezek mindegyike egymás után hozzá-

kapcsolható a növekvő tag-hoz, vagy külön megszintetizálható egy egységként, és egy reakcióban hozzákapcsolható a tag-hoz. A tag szekvenálását könnyebbé tehetjük, ha az elejéhez és a végéhez egy vagy több olyan aminosavat kapcsolunk, amelyek jelzik az információt hordozó rész kezdetét és végét (start szekvencia/vég szekvencia).

A kívánt receptorhoz kötődő ligandum azonosításához a fentiek szerint előállított könyvtárat a vizsgálandó akceptorral kezeljük, majd mossuk és izoláljuk azokat a hordozókat, amelyekhez az akceptor hozzákötődve marad.

A jelen találmány szerinti lehetséges akceptorok makromolekuláris egységek, amelyeknek van affinitásuk egy vagy egynél több ligandumhoz. A jellemző példák receptorok, beleértve a szerotonin receptort, a GABA receptort és a benzodiazepin receptort; a transzport fehérjék, azaz például a nátrium- és kálium-csatornák, az ellenanyagok és az enzimek, azaz például a proteázok, a trombin, a renin, az ACE, az aromatáz és a reverz transzkriptáz; vagy ezeknek olyan fragmensei, amelyek a ligandummal szemben ugyanazzal a kötési tulajdonságokkal rendelkeznek. Az ezeket az akceptorokat megkötő ligandumok antagonistaként, inhibítorként, agonistaként vagy az akceptorok markereként működnek.

Hacsak eleve természetesen nincs jelen, akkor az akceptorokat egy azonosítható csoporttal látjuk el, azaz például fluoreszkáló, kemolumineszkáló vagy radioaktív izotópot tartalmazó csoporttal, avidinnal, biotinnal, riporter enzimekkel, immunológiai kimutatható csoportokkal (ELISA) vagy hasonló-

kal. Az előzőkben említett markerekkel való jelzés módszerei és az affinitáskromatográfia általában ismert a szakterületen.

Azoknak a hordozóknak az izolálását, amelyekhez az akceptor hozzákötődik, manuálisan végezzük, a hordozók szortírozásával, azaz például UV vagy kék fény alatt fluoreszkáló akceptorok esetében, vagy automatizált berendezés segítségével, amelyet általában sejtek szortírozására használnak.

Az ílymódon izolált minden egyes hordozó tag-ját a peptid-elemzés szokványos módszereivel lehet szekvenálni, azaz például Edman degradációval, és az említett hordozóhoz kapcsolódó hordozót tisztán azonosítani lehet. A szekvenálást a ligandum szeparálása előtt és után is el lehet végezni, azaz például automata szekvenáló berendezéssel, a hordozóhoz kapcsolódó tag-nál. A ligandum szeparálása után szekvenálást részesítjük előnyben, mivel ebben az esetben a ligandumról felszabaduló monomerek nem zavarják a szekvenálást. Egy másik lehetőség a ligandumok terminális derivatizálása (azaz például acilezéssel), így ezek nem bomlanak el a tag elemzésekor.

Egy további lehetőség a tag szeparálása a hordozótól, majd a tag szekvenálása.

A kötési teszt során fellépő fals pozitív eredmények kizárására a ligandumokat teljesen vagy részben szeparálhatjuk az egyes hordozóktól, és homogén oldatban további vizsgálatnak vethetjük alá, azaz például egy második vizsgáló eljárásnak, amelyben az akceptorhoz való kapcsolódásukat vizsgáljuk. A ligandum szeparálását befolyásolja például a linker hasítása a hordozó és a ligandum között, az említett linkerre specifikus

reakcióval. Ha a linker p-hidroxibenzoésav, akkor ezt a hasítást az egyes hordozók gázállapotú ammóniával, telített ammónia/THF oldattal vagy folyékony ammóniával való kezelésével végezhetjük el (például mikrotiter lemezeken). A szeparált ligandumot azután lemoshatjuk a hordozóról, és még egyszer vizsgálhatjuk a kötődését a receptorhoz, vagy egy további vizsgálatot is elvégezhetünk, amely nem végezhető el a hordozóhoz kapcsolt ligandumokkal. Ilyenek például a kötési vizsgálatok, az olyan vizsgálatok, amelyekben a fényelnyelést mérjük, illetve az MS, IR vagy NMR vizsgálatok.

A linker megfelelő megválasztása azt is lehetővé teszi, hogy az első vizsgálatban a ligandumok első részét elválasszuk az izolált hordozóktól, gázállapotú ammóniával való kezeléssel, majd a ligandumok második részét egy másik vizsgálatban használjuk, ammónia/THF oldattal vagy folyékony ammóniával kezelve. Ebben az esetben a megfelelő linker a 4-hidroximetilbenzoésav.

Egy tipikus példa a potenciális trombin inhibitorok könyvtárának szintézise, amelyek a természetben elő nem forduló aminosavakat és egyéb építőköveket tartalmaznak, és így sokkal ellenállóbbak a proteázoknak.

A könyvtár például pentamerekből áll, amelyekben 2 konstans és 3 variábilis pozíció található, összetételük a következő:

X - Y - Z - Pro - GABA

X= 2-cianobenzolszulfonil, D-Phe, N-benzilglicin, β -Ala vagy acetil

Y= L-Pro, D-Pro, β -Ala vagy L-Asp

Z= L-Arg, D-Arg, β -Ala, L-Asp vagy szarkozil

Ez a készítmény $5 \times 4 \times 4 = 100$ lehetőséget biztosít a ligandumok összetételére.

Az egyes monomereket az azonosító struktúrában dipeptidek kódolják.

Ennek a könyvtárnak az átvizsgálása után azt találtuk, hogy a D-Phe-D-Pro-Arg-Pro-GABA és a D-Phe-Pro-D-Arg-Pro-GABA pentapeptidek mind hatékony trombin inhibitorok.

A jelen találmány tárgya tehát a D-Phe-D-Pro-Arg-Pro-GABA és a D-Phe-Pro-D-Arg-Pro-GABA képletű vegyület, vagy ezeknek gyógyászatilag elfogadható sói, trombin gátlására; valamint gyógyászati készítmények, amelyek tartalmazzák az említett trombin inhibitorokat, önmagukban, vagy további opcionális töltőanyagokkal kombinálva.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá minden, az új eljárással kimutatott vegyület, amelyet a humán vagy állati test terápiás és profilaktikus kezelésére fel lehet használni. Az előnyben részesített felhasználási terület a terápiás és profilaktikus kezelés, a trombin funkcióval, azaz az embóliával és trombózisokkal kapcsolatban.

A jelen találmány szerinti gyógyászati készítmények enterális, azaz például orális és emellett rektális és parenterális beadás céljára alkalmasak, például szubkután, intravénás vagy intraperitoneális beadásra, melegvérű állatoknak, és a farmakológiailag aktív adalékanyagot vagy önmagában vagy egy gyógyászatilag elfogadható hordozóval együtt tartalmazzák. A napi dózis függ a beteg korától és egyedi állapotától, valamint a beadás módjától.

Az új gyógyászati készítmények 10-80%, előnyösen 20-60% aktív adalékanyagot tartalmaznak. Az enterális vagy parenterális beadás céljára készített gyógyászati készítmények tipikusan egységdózis formájában vannak, azaz például drazsék, tabletták, kapszulák vagy kúpok, és emellett ampullák formájában. Ezeket a dózisformákat önmagában ismert módon állítjuk elő, általában szokványos keveréssel, granulálással, konfekcionálással, oldással vagy liofilezési módszerekkel.

Az orális beadásra alkalmas gyógyászati készítményeket részesítjük előnyben. A megfelelő hordozók főleg töltőanyagok, azaz cukrok, legegyszerűbb, ha laktóz, szacharóz, mannitol vagy szorbitol, cellulóz készítmények és/vagy kalcium-foszfátok, általában trikálcium-foszfát vagy kalcium-hidrogén-foszfát, emellett kötőanyagok, azaz keményítőpaszták, általában kukorica-, búza-, rizs- vagy burgonya-keményítő, zselatin, tragantmézga, metilcellulóz és/vagy polivinil-pirrolidon, és/vagy, ha szükséges, akkor dezintegrátorok, azaz például az előzőekben említett keményítők, valamint a karboximetil-keményítő, keresztkötéses polivinil-pirrolidon, agar, alginsav vagy annak sója, azaz például a nátrium-alginát. A töltőanyagok főleg csúsztatóanyagok, áramlást szabályozó ágensek, és síkosító anyagok, általában szilikátok, talkum, sztearinsav vagy sói, általában a magnézium-sztearát vagy kalcium-sztearát és/vagy a polietilén-glikol. A drazsé-magokat megfelelő nem-enterális vagy enterális borítással láthatjuk el, általában tömény cukoroldatokat használva, amelyek tartalmazhatnak gumiarábikumot, talkumot, polivinil-pirrolidont, polietilén-glikolt és/vagy titándioxidot, sellak oldatokat megfe-

lelő szerves oldószerekben vagy oldószer-keverékekben, vagy az enterális borítás elkészítéséhez megfelelő cellulóz készítmények oldatait, azaz például acetil-cellulóz-ftalát vagy hidroxipropilmetil-cellulóz-ftalát oldatát. Festékeket és pigmenteket adhatunk a tablettákhoz és drazsékhoz, hogy egyszerűen azonosítani vagy jelezni lehessen a hatóanyag különböző dózisait.

Az orális beadáshoz használt további gyógyászati készítmények zselatinból készült, szárazon töltött kapszulák, valamint lágyan zárt kapszulák, amelyek zselatinból és egy lágyítóanyagból, azaz például glicerinnél vagy szorbitolból állnak. A szárazon töltött kapszulák a hatóanyagot tartalmazhatják granulátum formájában, egyszerűen töltőanyagokkal, azaz például laktózzal elkeverve, kötőanyagokkal, azaz például keményítővel elkeverve és/vagy csúsztatóanyagokkal, azaz például talkummal vagy magnézium-sztearáttal elkeverve, és emellett vagy tartalmaznak stabilizálószerrel vagy nem. A lágy kapszulákban az aktív adalékanyagot előnyösen megfelelő folyadékban oldjuk vagy szuszpendáljuk, általában zsírolajban, paraffinolajban vagy folyékony polietilén-glikolban, amelyhez stabilizálószerrel adunk.

A rektális beadáshoz használt megfelelő gyógyászati készítmények általában kúpok, amelyek az aktív adalékanyag és egy kúp-alapanyag keverékéből állnak. A megfelelő kúp-alapanyagok lehetnek például természetes vagy szintetikus trigliceridek, paraffin-szénhidrogének, polietilén-glikolok és magasabb szénatomszámú alkanolok. Az is lehetséges, hogy zselatin kapszulákat használjunk a rektális beadáshoz, amelyek az aktív adalékanyagot egy alapanyaggal kombinálva tartalmazzák. A megfelelő alapanyagok

általában folyékony trigliceridek, polietilén-glikol vagy paraffin szénhidrogének.

A parenterális beadáshoz használt gyógyászati készítmények az aktív adalékanyag vizes oldatát vagy szuszpenzióját tartalmazzák, egyszerűen olajos injekciós szuszpenziók, amelyekhez megfelelő lipofil oldószereket vagy hordozókat használunk, azaz például zsírolajokat, általában szezámolajat vagy szintetikus zsírsav-észtereket, azaz például etil-oleátot vagy triglicerideket, vagy vizes injekciós szuszpenziók, amelyek tartalmazhatnak viszkozitást növelő anyagokat, általában karboximetil-cellulózt, szorbitolt és/vagy dextránt, és vagy tartalmazznak stabilizálószerrel vagy nem.

A találmány tárgyát képezik továbbá az előzőekben említett trombin inhibitorok, előnyösen gyógyászati készítmény formájában. Az aktív adalékanyag dózisa függ a melegvérű állat fajától, a beteg korától és általános állapotától, valamint a beadás módjától. A tervezett napi dózis egy körülbelül 75 kg súlyú beteg parenterális kezeléséhez körülbelül 0,1-500 mg, előnyösen 1-50 mg.

A találmányt az alább következő példákban részletesen ismertetjük.

Az alábbi rövidítéseket használjuk:

DCCI = diciklohexil-karbodiimid

DCE = diklóretán

DICD = diizopropil-karbodiimid

DIPEA = diizopropiletilamin

DMA = dimetilacetamid

DMF = dimetilformamid
 DMAP = dimetilaminopiridin
 DMSO = dimetilszulfoxid
 Fmoc = fluorenilmetiloxikarbonil
 GABA = γ -aminovajsav
 HOBt = hidroxibenzotriazol
 Net₃ = trietilamin
 Osu = O-szukcinimid
 Pip = piperidin
 PMC = pentametilkrománszulfonil
 Trt = tritil

Az ismétlődő kezeléseket sarzs eljárással végezzük a peptidkémiaiban általában használt szilárd fázisú technika eljárással [Fields és mtsai: Intern. J. Pept. Prot. Res. 35, 161-214 (1990)], azaz a reagens oldatokat a gyantához hozzáadva, majd ezt követően megszűrve (a szűrletet gyenge vákuumban izoláljuk).

Egy könyvtár leírását ismertetjük (lásd az 1-es reakció-sémát), amely két konstans és 3 variábilis pozícióval rendelkező pentamerekből áll, összetétele:

X - Y - Z - Pro - GABA

X = 2-cianobenzolszulfonil, D-Phe, N-benzilglicin, β -Ala, acetyl

Y = L-Pro, D-Pro, β -Ala, L-Asp

Z = L-Arg, D-Arg, β -Ala, L-Asp, szarkozil.

Az előzőekben ismertetett egyedi monomereket az azonosító struktúrában az alábbi dipeptidek kódolják:

<u>Építőkövek</u>	<u>Dipeptid</u>
2-cianobenzolszulfonil	
klorid	DG
D-Phe	GD
N-benzilglicin	GF
β -Ala	AA
Acetil	AG
L-Pro	DA
D-Pro	GA
L-Arg	GG
D-Arg	NG
L-Asp	AN
szarkozil	NA

1. Példa

Tritillel védett aminosavak és dipeptidek készítése

Mindegyik dipeptidből vagy aminosavból 10 mmol-t szuszpendálunk 36 ml kloroform/acetonitril (4:1) elegyben. Ezután lassan, cseppenként 10 mmol trimetilszilil-kloridot adunk hozzá, és a reakcióelegyet 2 óra hosszat 65 °C-on refluxáltatjuk. Ezután cseppenként 20 mmol trimetilamint adunk hozzá, majd végezetül 10 mmol tritilklorid 10 ml kloroformos oldatát adjuk hozzá. 60 perc elteltével metanolt adunk hozzá fölöslegben, majd újabb 5 perc elteltével a reakcióelegyet bepárlással töményítjük és a maradékot megszáritjuk. A nyersterméket jégbehűtött 2 mol/l koncentrációjú kálium-hidrogénszulfát oldatban (vagy citromsavban) vesszük fel, majd az oldatot etilacetáttal extraháljuk.

Vizes lúggal való visszaextrahálás után (körülbelül 5 °C-on) a vizes fázis pH-ját kálium-hidrogénszulfát oldattal 6-7 közé állítjuk. A Trt-dipeptid vagy Trt-aminosav kicsapódik, majd etilacetáttal extraháljuk. A szerves fázishoz 10 mmol tri-etilamint adunk, majd a sarzsot bepárlással betöményítjük (a Trt-dipeptid vagy a Trt-aminosav trietilammónium sója).

Így állítjuk elő a Trt-dipeptideket (DG, GD, GF, AA, AG, DA, GA, GG, NG, AN és NA) valamint a Trt-aminosavakat (A, D, F, G és N).

2. Példa

A hordozó gyanta részleges derivatizálása a tag konstans egységének az ekvivalens mennyiségnél kisebb mennyiségével

A Polyhipe SU 500 gyanta (Novabiochem) 181 μmol reakcióképes alkilamino csoportját etiléndiaminnal derivatizáljuk, 5 x 40 másodpercig 20%-os Pip/DMA-val mossuk, majd 10 x 60 másodpercig DMA-val mossuk szobahőmérsékleten.

Felvitel: körülbelül 430 $\mu\text{mol/g}$ ekvivalens körülbelül 2000 pmol/g gyantarészecskével (gyöngy).

Az előaktiváláshoz 60 μmol Trt-Gly-OH- Net_3 -at oldunk 66 μmol (a HOBt alapján), 0,5 mol/l HOBt/DMA oldatban, majd ehhez az oldathoz 66 μmol (a DICD alapján) 2 mol/l koncentrációjú DICD/DMA oldatot. 40 percig szobahőmérsékleten tartjuk, majd a keveréket 2 ml DMA-val hígítjuk, majd az oldatot a gyantára pipettázzuk. Közvetlenül ezután 66 μmol DIPEA-t adunk hozzá. A kapcsolási reakciót 60 percig folytatjuk. A gyantát 10 x 45 másodpercig öblítjük DMA-val.

2.1. Példa

A tag-töltés meghatározása a szabad aminocsoportok mérésével

Az Fmoc riporter csoportot a gyantához kapcsoljuk, majd a fölösleg kimosása után ismét lehasítjuk és megmérjük.

Eljárás:

275 μmol Fmoc-Osu-t oldunk 2,1 ml DMA-ban, majd hozzáadjuk a gyantához. Közvetlenül ezután 413 μmol (a DIPEA alapján) 1,5 mol/l koncentrációjú DIPEA/DMA oldatot pipettázunk a gyantára. 80 percig hagyjuk szobahőmérsékleten, majd a gyantát 10 x 18 másodpercig mossuk DMA-val. A Fmoc csoport eltávolítására a gyantát 15 x 40 másodpercig szobahőmérsékleten 20%-os Pip/DMA-val kezeljük. Az összegyűjtött szűrleteket meghatározott módon hígítjuk, majd meghatározzuk a 299,8 nm-en mérhető extinkciójukat. A szabad aminocsoportok teljes száma körülbelül 154 μmol , azaz a gyantára felvitt teljes mennyiség 85%-a (a ligandum százaléka). A gyanta tag töltése így körülbelül 15 százalék.

3. Példa

A ligandum linkerének hozzákapcsolása a gyantához

A preaktiváláshoz 769 μmol 4-hidroximetilbenzoésavat oldunk 845 μmol (a HOBT alapján) 0,5 mol/l koncentrációjú HOBT/DMA oldatban, majd az oldatot 845 μmol (a DICD alapján) 2 mol/l koncentrációjú DICD/DMA oldathoz adjuk hozzá. 40 percig hagyjuk szobahőmérsékleten, majd a reakcióelegyet 0,3 ml DMA-val hígítjuk és a gyantára pipettázzuk. Közvetlenül ezután 845 μmol DIPEA-t adunk hozzá és a kapcsolási reakciót további 60 percig

6. Példa

A ligandum és a megfelelő tag variábilis részeinek szintézise

5, egyenként 19 μmol -os részre osztjuk szét a kiindulási anyagot (egy rész minden egyes, ebben a pozícióban lehetséges variánshoz).

6.1. Példa

A ligandum 1. variábilis pozíciójának szintézise

Először a ligandumról eltávolítjuk az Fmoc csoportot a 2. példában leírtak alapján. Ezután végrehajtjuk a külön kapcsolási reakciókat az 1. variábilis pozícióhoz (Z pozíció):

Pool	Monomer	Mennyiség	Kódolás
1	Fmoc-L-Arg(PMC)-OH	76 μmol	GG
2	Fmoc-D-Arg(PMC)-OH	76 μmol	NG
3	Fmoc- β -Ala-OH	76 μmol	AA
4	Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	76 μmol	AN
5	Fmoc-szarkozil-OH	76 μmol	NA

Mindegyik, az előzőekben említett Fmoc építőkövet 85 μmol HOBT oldattal preaktiváljuk (0,5 mol/l DMA-ban), majd hozzáadunk 84 μmol DICD oldatot (2 mol/l DMA-ban) 40 percre szobahőmérsékleten, majd, 230 μl DMA-val végzett hígítás után, hozzáadjuk egy gyantarészhez. Közvetlenül ezután 84 μmol DIPEA-t adunk hozzá. A kapcsolást 45 percig végezzük szobahőmérsékleten. Egy kapcsolás utáni reakciót is elvégzünk további 35 percig, egy azonos össze-

tételű eleggyel. Az acetilezést és a mosást az 5. példában leírtak alapján hajtjuk végre.

6.2. Példa

A tag láncának meghosszabbítása dipeptidekkel

Kódtáblázat alapján a 6.1 példában szereplő minden egyes pool-ban, a kapcsolt monomer szerint, az 1. példában ismertetett, a monomert kódoló Trt peptiddel a tag részt egyenként tovább szintetizáljuk (lásd 2. reakcióséma).

Először az irreverzibilisen kapcsolt tag tritil csoportokat távolítjuk el diklóretánban oldott 5 százalékos hangyasavval (2 x 1 perc), majd mossuk:

5 x 45 másodpercig DMA-val

3 x 45 másodpercig 3%-os trietilamin DMA-s oldatával

3 x 45 másodperc DMA-val.

Ezután a dipeptideket a megfelelő tag-okhoz kapcsoljuk, külön-külön reakciókban.

1	Trt-GG	129 μ mol
2	Trt-NG	129 μ mol
3	Trt-AA	129 μ mol
4	Trt-AN	129 μ mol
5	Trt-NA	129 μ mol

Az előzőekben listázott Trt-dipeptideket 40 percig preaktiváljuk 142 μ mol HOBT-vel és 142 μ mol DICD oldattal (DMA-ban). Az oldatokat azután hozzáadjuk a megfelelő gyantarészekhez, és azonnal kezeljük 142 μ mol DIPEA-val. A kapcsolási reakciót 60

percig folytatjuk szobahőmérsékleten majd a mosást az alábbiak szerint végezzük:

2 x 45 másodperc DMA-val

1 x 5 perc ecetsavanhidrid:piridin:DMA eleggyel (1:1:8 térfogatarány)

5 x 45 másodperc DMA-val.

6.3. Példa

A tag láchosszabbítása egyedi aminosavakkal (a 6.2 példa alternatívája)

Először a tag-nak a gyantához irreverzibilisen hozzákapcsolt tritilcsoportjait távolítjuk el 5 százalékos hangyasav diklóretános oldatával (a 2. példában leírtak alapján).

Mindegyik tag komponens 4,3 μmol -ja 5 részéhez:

1	Trt-G(I)	129 μmol
	Trt-G(II)	129 μmol
2	Trt-G(I)	129 μmol
	Trt-N(II)	129 μmol
3	Trt-A(I)	129 μmol
	Trt-A(II)	129 μmol
4	Trt-N(I)	129 μmol
	Trt-A(II)	129 μmol
5	Trt-A(I)	129 μmol
	Trt-N(II)	129 μmol

Az előzőkben listázott Trt-aminosavakat 40 percig preaktiváljuk 142 μmol HOBt-vel és 142 μmol DICD oldattal (DMA-ban). Az oldatokat azután hozzáadjuk a megfelelő gyantarészekhez, és

azonnal 142 μmol DIPEA-val kezeljük. A kapcsolási reakciót azután 60 percig végezzük szobahőmérsékleten, majd azután az alábbiak szerint mossuk:

2 X 45 másodperc DMA

1 x 5 perc ecetsavanhidrid:piridin:DMA eleggyel (1:1:8 térfogatarány)

5 x 45 másodperc DMA-val.

Miután a Trt csoportokat ez előzőkben ismertetett módon eltávolítottuk, mindegyik, az előzőkben (II) alatt listázott Trt-aminosavat kapcsoljuk, az előzőkben jelzett módon.

6.4. Példa

A ligandum második variábilis részének szintézise

Az Y pozíciót lényegében ugyanúgy vesszük be mint a Z pozíciót (az eltérő kódolás szerint) (lásd a 2. reakciósémát). Ezt úgy csináljuk, hogy összekeverjük a 6.2. és a 6.3 példában szereplő összes mintát, majd 4 egyforma részre osztjuk (4 Y rész).

Ebben a 4 külön részben minden, az ebben a pozícióban lehetséges monomert a 6.1 példában leírtak alapján kapcsolunk.

Pool	Monomer	Mennyiség	Kódolás
1	Fmoc-L-Pro-OH	76 μmol	DA
2	Fmoc-D-Pro-OH	76 μmol	GA
3	Fmoc- β -Ala-OH	76 μmol	AA
4	Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	76 μmol	AN

Amint azt a 6.2. vagy a 6.3. példában ismertettük, a monomerhez tartozó tag-ot ezután kapcsoljuk.

6.5. Példa

A ligandum 3. variábilis pozíciójának szintézise

Az X pozíciót lényegében az Y vagy a Z pozíció bejuttatása szerint végezzük (az eltérő kódolást figyelembe véve) (lásd a 2. reakciósémát). Ezt úgy csináljuk, hogy összekeverjük a 6.4. példa összes mintáját, majd 5 egyforma részre osztjuk szét (5 X rész).

Ebben az 5 különböző részben mindegyik, az ebben a pozícióban lehetséges monomert a 6.1 példában leírtak alapján kapcsoljuk.

Pool	Monomer	Mennyiség	Kódolás
1	2-cianobenzol-szulfonilklorid	76 μ mol	DG
2	Fmoc-D-Phe-OH	76 μ mol	GD
3	Fmoc-N-benzilglicin-OH	76 μ mol	GF
4	Fmoc- β -Ala-OH	76 μ mol	AA
5	ecetsavanhidrid	76 μ mol	AG

A 2-cianobenzolszulfonilkloridos kapcsolást szulfonilklorid piridin/DMA-ban készült oldatával való reakcióban végezzük, szobahőmérsékleten; az ecetsavanhidrides kapcsolást az 5. példában ismertetjük.

7. Példa

A védőcsoport eltávolítása a ligandumról

A védett formában (de nagyszámú komponenssel) kapott könyvtár megfelelő számú gyantarészecskéjét védőcsoport eltávolítási reakciónak vetjük alá, amelyet általában a peptidkémiaiában használnak, hogy eltávolítsuk az Fmoc és terc-butil védőcsoportokat. Az Fmoc védőcsoport eltávolításához a 6.5. példában szereplő gyantát ismételten kezeljük 20 százalékos Pip/DMA oldattal (lásd 2. példa), majd a t-butil és Pmc védőcsoportok eltávolítására 40 percig szobahőmérsékleten 95 százalékos trifluorecetsavval kezeljük (5 százalék víz + 2 százalék etánditiol). Ha a ligandumnak a gyantához való kötődése érintetlen, akkor a ligandumban levő funkciós csoportok és a tag teljes egészében felszabadul. A mosást ezután az alábbiak szerint hajtjuk végre:

4 x 45 másodperc DCE

4 x 45 másodperc izopropanol

4 x 45 másodperc izopropanol:H₂O = 1:1 térfogatarány

5 x 45 másodperc H₂O.

8. Példa

A trombin jelzése fluoreszceinnel

Izotiocianátot adunk humán trombin oldatához (0,53 mg 100 µl borát pufferben, pH=8) (10 µl oldat, 2,9 mg 290 µl DMSO-ban). A reakciót további 60 percig folytatjuk szobahőmérsékleten, majd a reakcióelegyet gélkromatográfiával dolgozzuk fel (Sephadex-G25, 15x0,5 cm) (eluálás 1 mol/l nátrium-kloriddal).

A fluoreszcein-trombin frakcióból 20 μl -t (a frakció-térfogatnak körülbelül 3%-a) 500 μl -re hígítunk, majd 495 nm-en fotometriásan mérjük. Így kapunk körülbelül 2 $\mu\text{mol/l}$ fluoreszcein koncentrációt. A fluoreszcein/trombin arány így körülbelül 1:1.

9. Példa

A trombinkötő ligandumok azonosítása heterogén fázisban

Körülbelül 500, a 7. példából származó gyantát inkubálunk 2,2 μl , a 8. példából származó fluoreszceinnel jelzett trombinnal, 10 percig, szobahőmérsékleten, miután 3x1 percig mostuk az alábbi összetételű oldattal:

68	mg	imidazol
876	mg	NaCl
147	mg	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
3,35	mg	PEG (3350)

100 m-re feltöltve vízzel,

A gyantákat hosszúhullámú fényben (470 nm hullámhosszú kék fény) vizuálisan megvizsgáljuk, mutatnak-e fluoreszcenciát. A megfelelő fluoreszcenciát mutató részeket kiválogatjuk és mossuk

5 x 3 perc formamid és

10x H_2O ,

majd ezt követően szárítjuk.

10. Példa

Az egyes gyöngyökhöz kötött ligandumok trombingátlásának vizsgálata folyadékfázisban

A 9. példában kiválasztott gyöngyöket 24 óra hosszat telített ammóniás THF oldatban tartjuk szobahőmérsékleten. Ezután egyenként egy szűrőlemezekkel ellátott mikrotiter lemez (azaz például Millipore MultiScreen DV96, pórusméret $0,65\ \mu\text{m}$) megszámozott lukaiba tesszük a gyöngyöket. A ligandumokat tetrahidrofurán/víz eleggyel moshatjuk egy második, megszámozott mikrotiter lemezbe, ahol közvetlenül vizsgálhatók a trombin inhibíciós tesztben. Lukanként $2,3 \times 10^{-2}$ NIH egység trombint és $9,3\ \mu\text{g}$ S-2302 kromogén szubsztrátot (D-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilid 2HCl ; ex Chromogenix) adunk hozzá $150\ \mu\text{l}$ végtérfogatban. A körülbelül 75 perc alatt kifejlődő szint Multiwell-Platereader-rel mérjük $405\ \text{nm}$ -en, majd a megfelelő extinkciós értékeket az idő függvényében ábrázoljuk. A különböző inhibitorok diagramjai gradienseinek kereszt-összehasonlítása adja az alapot az inhibitor aktivitással rendelkező ligandumok azonosítására.

Két ilyen azonosított trombin-inhibitor összetételét határozzuk meg a tag-ról. Ezt úgy végezzük el, hogy a gyöngyök minden egyes tag-ját, amelyek az egyes ligandumokhoz tartoznak, szilárd fázisú fehérje szekvenálással (Edman degradáció) egy automatizált szekvenáló berendezésben (ABI 477, kapható az Applied Biosystems-től) elválasztjuk, és azonosítjuk a két ligandum összetételét a kódtáblázat alapján. Az összetétel a következő:

D-Phe-D-Pro-Arg-Pro-GABA

és

D-Phe-Pro-D-Arg-Pro-GABA.

Molekulasúly mindegyik esetben $600,7$ (MALDI-MS $\text{M}+\text{H}^+$).

A reakciósémákat az 1-3. képletoldalakon ismertetjük.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Több különböző egységet tartalmazó könyvtár, amely egységek tartalmaznak egy szilárd- vagy félig szilárd hordozót (gyöngy), egy szintetikus oligomert (ligandum) és egy azonosítási struktúrát (tag), amelynek segítségével a ligandum monomerei azonosíthatók, azzal jellemezve, hogy:

a) mindegyik hordozó csak egyetlen típusú ligandumot hordoz,

b) a ligandum és a tag ugyanahhoz a hordozóhoz kötődik, különböző pozícióban,

c) a ligandum, függetlenül a tag-tól és anélkül, hogy megváltoztatnánk az információtartalmát, elválasztható a hordozótól,

d) a tag egy szekvenálható polipeptid, és

e) a tag vagy a ligandum szintéziséhez egy védőcsoportot használunk, amely enyhe savas körülmények között eltávolítható.

2. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben az enyhe savas körülmények között eltávolítható védőcsoport legalább tízszer érzékenyebb mint a dimetildimetoxibenziloxikarbonil védőcsoport.

3. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben az enyhe savas körülmények között eltávolítható védőcsoport egy tritil típusú védőcsoport.

4. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandumok olyan monomereket tartalmaznak, amelyek abban a mennyi-

ségben, amelyben egy hordozóegységen előállíthatók, nem azonosíthatók világosan ismert és/vagy automatizált eljárásokkal.

5. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum egy hasítható linkeren keresztül kapcsolódik a hordozóhoz.

6. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum egy lúgosan, savasan, fotolitikusan, oxidatív vagy redukzív körülmények között lehasítható linkeren keresztül kapcsolódik a hordozóhoz.

7. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum lúgos körülmények között lehasítható hordozón keresztül kapcsolódik a hordozóhoz.

8. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum több részletben hasítható le a hordozóról.

9. Az 5. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a linkert a következő csoportból választjuk: p-hidroximetil-benzoésav, 4-hidroximetilfenilecetsav, benzhidrilamino-, allil-, hidroxikrotonilaminometil-csoport, 3-nitro-4-hidroximetilbenzoésav, p-nitro-benzhidrilamin, 4-[4,4'-bisz(metilszulfonil)-2-oxibenzhidrilamino]vajsav és diszulfid.

10. Az 5. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a linker 4-hidroximetilbenzoésav.

11. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum minden egyes monomerjét egynél több aminosav kódolja.

12. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a tag egy konstans induló szekvenciát tartalmaz.

13. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a tag egy konstans végszekvenciát tartalmaz.

14. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum egy konstans induló szekvenciát tartalmaz.

15. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum egy konstans végszekvenciát tartalmaz.

16. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a polimer gyanta szabad aminocsoportokat tartalmaz.

17. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum-tag arány egy hordozón egynél nagyobb.

18. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum-tag arány egy hordozón 2 és 100 között van.

19. Az 1. igénypont szerinti könyvtár, amelyben a ligandum-tag arány egy hordozón 4 és 10 között van.

20. Eljárás az 1. igénypont szerinti könyvtár előállítására, azzal jellemezve, hogy a ligandumokat és a tag-okat ortogonális és alternáló szintézissel szintetizáljuk.

21. Eljárás a 20. igénypont szerinti könyvtár előállítására, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket alkalmazzuk:

a) a tag első egységének és a ligandum első monomerjének, vagy annak építőkövének, vagy egy mindegyikhez jó linkernek egy szilárd- vagy félig szilárd hordozóhoz való kapcsolása;

b) adott esetben további invariábilis monomerek hozzákapcsolása a ligandumhoz, vagy további invariábilis kódoló egységek hozzákapcsolása a tag-hoz;

c) a szilárd- vagy félig szilárd hordozót részekre osztjuk a ligandum variábilis monomerjeihez;

d) minden egyes résszel külön, kódolható sorrendben további módosításokat hajtunk végre a ligandumon, vagy a ligandumnak ebben a pozícióban lehetséges variábilis monomerjei közül egy újabbat kapcsolunk, valamint az ezt a lépést kódoló tag egységét;

e) összekeverjük a részeket;

f) a b) és e) lépéseket addig ismételjük, ameddig a ligandumok variábilis részét megszintetizáljuk, és

g) adott esetben egy vagy több nem-variábilis monomert kapcsolunk a ligandumhoz, vagy további nem-kódoló egységeket kapcsolunk a tag-hoz;

a tag vagy a ligandum szintéziséhez egy olyan védőcsoportot alkalmazva, amely enyhe savas körülmények között eltávolítható.

22. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy ortogonális védőcsoportokat használunk a ligandum és a tag szintézisére.

23. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a védőcsoportok két csoportját használjuk a ligandum és a tag szintézisére, az első csoport enyhe savas körülmények között távolítható el, a második csoport enyhe lúgos körülmények között távolítható el, fénnel, vagy oxidatív vagy redukzív körülmények között.

24. A 20. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandum és a tag szintéziséhez két ideiglenes védőcsoportot használunk, az első csoport enyhe savas körülmények között távolítható el, a második csoport lúgos körülmények között távolítható el.

25. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az egyik védőcsoport tritil típusú (Trt).

26. A 21. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy védőcsoportként fluorenilmetoxikarbonil típusú (Fmoc) és tritil típusú (Trt) csoportokat használunk.

27. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandum szintézisét Fmoc védőcsoporttal végezzük.

28. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandum szintézisét tritil védőcsoporttal végezzük.

29. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandum és a tag monomerjeinek oldalláncait, amelyek nem vesznek részt a reakcióban, egy harmadik típusú védőcsoporttal védjük meg.

30. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandum és a tag monomerjeinek oldalláncait, amelyek nem vesznek részt a reakcióban, pentametil-krománszulfonil (PMC), Mtr vagy terc-butil típusú védőcsoporttal védjük meg.

31. Eljárás struktúrák kimutatására, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti könyvtárat a vizsgálandó akceptorral kezeljük, majd izoláljuk a könyvtárnak az akceptorhoz kötődő komponenseit.

32. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az akceptor egy receptor, egy transzportfehérje, egy ellenanyag, egy enzim vagy ezeknek egy fragmense.

33. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az akceptor egy azonosítható csoportot hordoz.

34. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az azonosítható csoport egy fluoreszkáló, kemolumineszkáló vagy radioaktív csoport, avidin, biotin, egy riporter enzim vagy egy immunológiailag kimutatható csoport.

35. A 33. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az azonosítható csoport egy fluoreszkáló csoport.

36. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az 1. igénypont szerinti könyvtárat egy fluoreszkáló csoportot hordozó akceptorral keverjük össze, mossuk, majd a könyvtárnak fluoreszcenciát mutató komponenseit izoláljuk.

37. A 31. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandumokat részben vagy teljesen elválasztjuk az izolált hordozóktól, majd újból megvizsgáljuk.

38. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a további vizsgálatot nem végezhetjük el a szilárd- vagy félig szilárd hordozóhoz kötött ligandummal.

39. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a további vizsgáló eljárás kötési vizsgálat, NMR vagy MS.

40. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandumokat egy illékony vagy gáz halmazállapotú ágenssel való kezeléssel választjuk le az izolált hordozókról.

41. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandumokat savas vagy lúgos kezeléssel választjuk le az izolált hordozókról.

42. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandumokat lúggal választjuk le az izolált hordozókról.

43. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandumokat gáz halmazállapotú ammóniás, folyékony ammóniás vagy ammónia/THF oldatos kezeléssel választjuk le az izolált hordozókról.

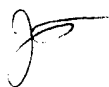
44. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a ligandumok első részét gáz halmazállapotú ammóniás kezeléssel, a második részét folyékony ammóniás vagy ammónia/THF oldatos kezeléssel választjuk le az izolált hordozókról.

45. A D-Phe-D-Pro-Arg-Pro-GABA vagy a D-Phe-Pro-D-Arg-Pro-GABA képletű vegyület, vagy annak gyógyászatilag elfogadható sója, a trombin gátlására.

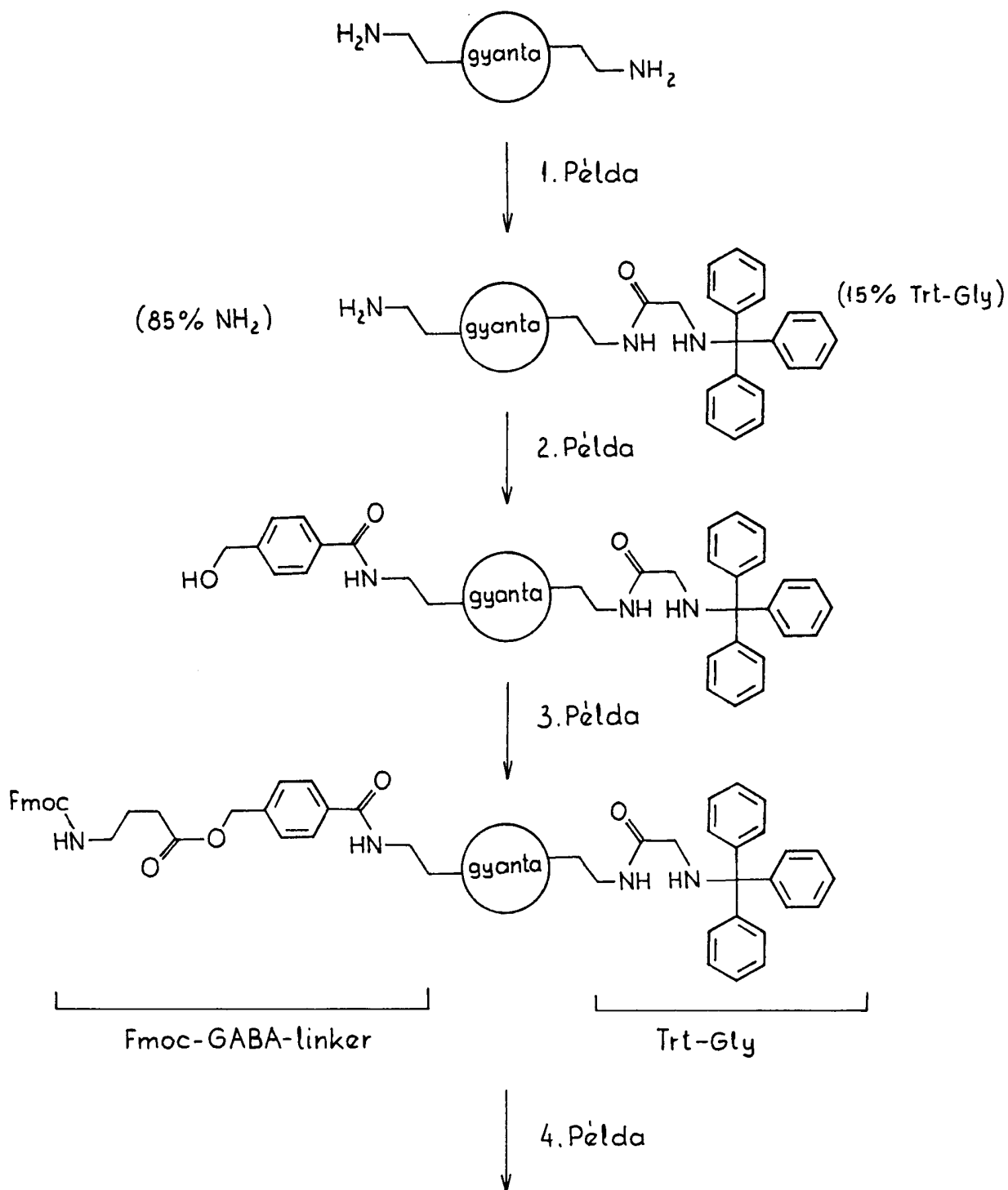
46. A D-Phe-D-Pro-Arg-Pro-GABA vagy a D-Phe-Pro-D-Arg-Pro-GABA képletű vegyületet, vagy annak gyógyászatilag elfogadható sóját és adott esetben töltőanyagokat tartalmazó gyógyászati készítmény.

36. sz.

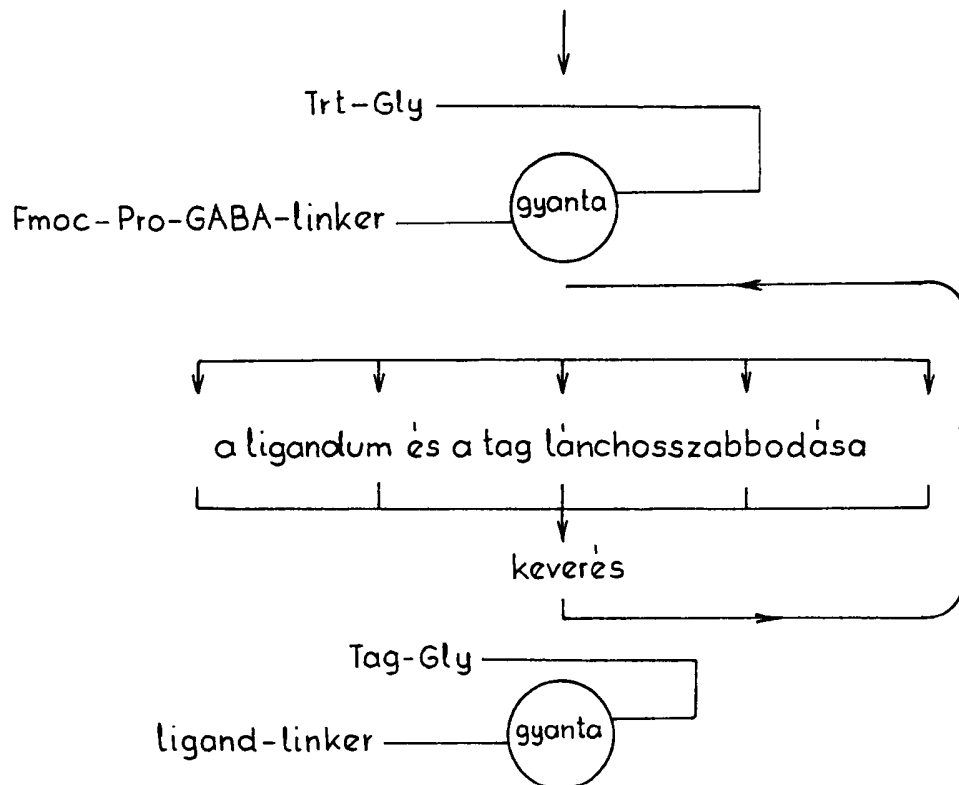
A meghatalmazott:



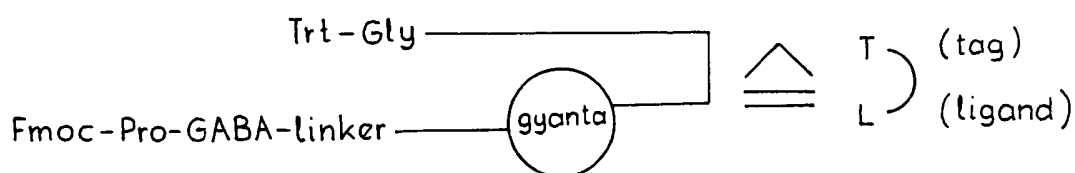

Farkas György dr.
Széchenyi István
Széchenyi István
H-1051 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-723

1. Reakcióséma

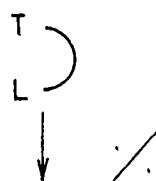
1. Reakcióséma (folytatás)

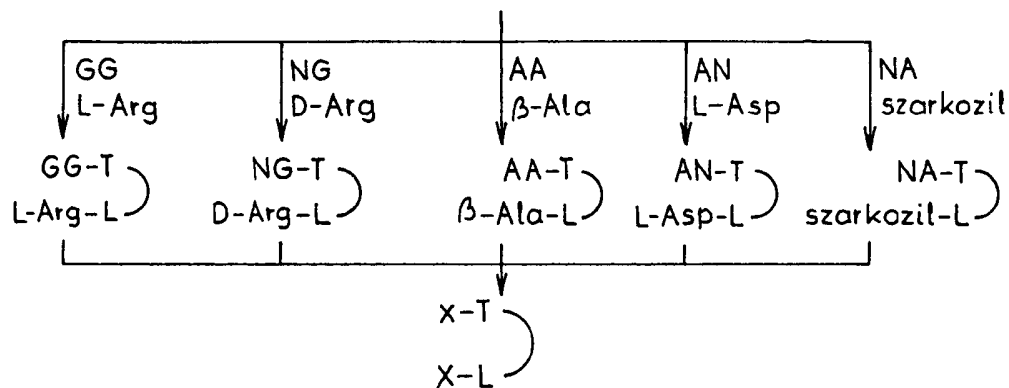


2. Reakcióséma

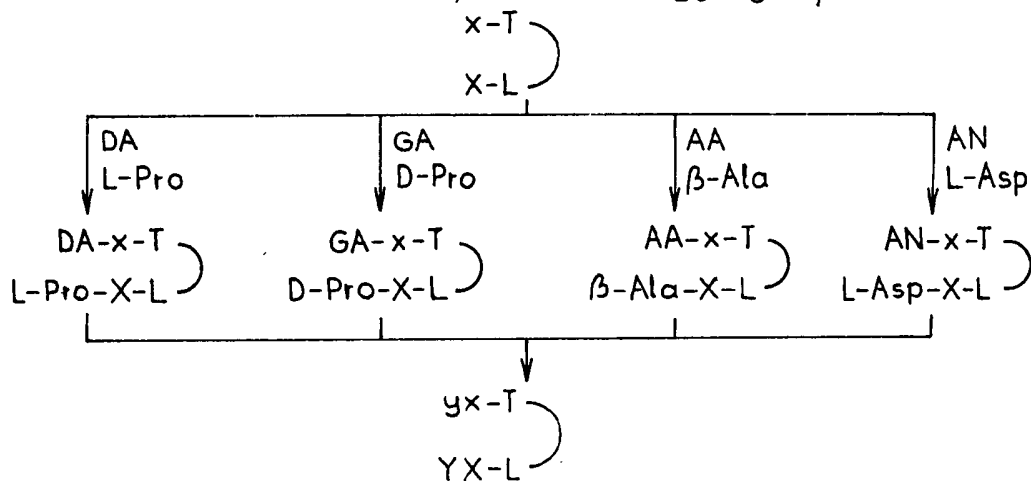


Az 1. variábilis monomer bejuttatása a ligandumba,
és az azt kódoló egység bejuttatása a tag-ba:

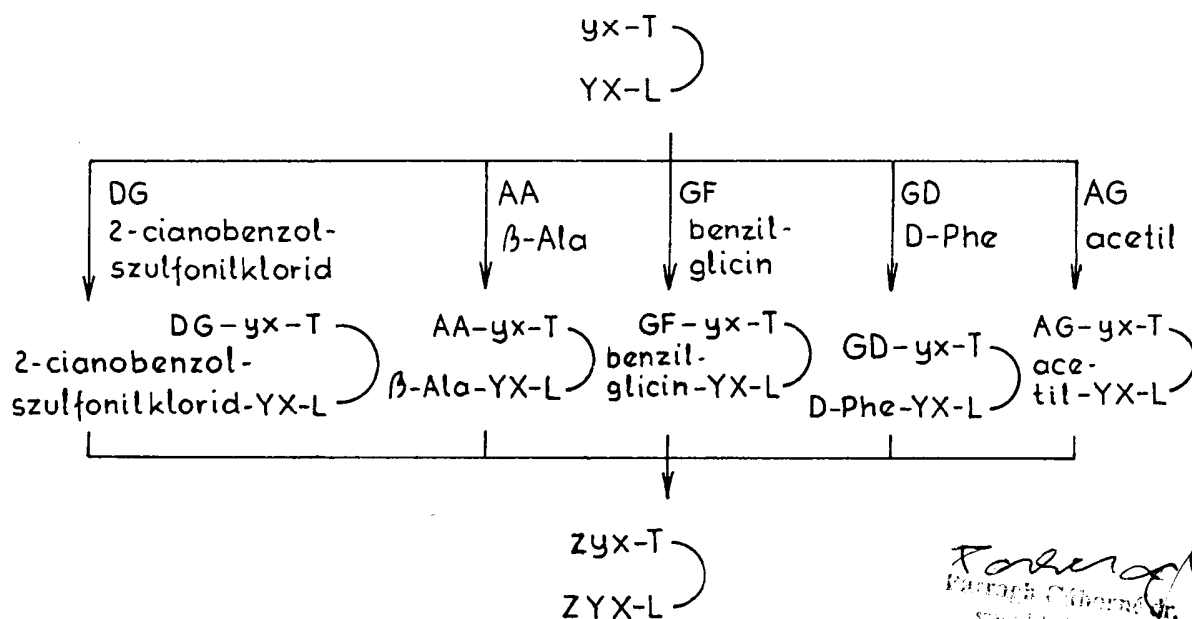


2. Reakcióséma (folytatás)

A 2. variábilis monomer és a 2.) azt kódoló egység bejuttatása



A 3. variábilis monomer és a 3.) azt kódoló egység bejuttatása



Fodor György
 Fodor György dr.
 sz. adó: 113 23 23
 az 113. sz. T. törvény
 Sz. adó: 113 23 23
 H-106, Budapest, Andrássy út 113.
 telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-923