(19)

SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 904851 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 904851

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **02.10.1990**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **02.10.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **04.04.1991**

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

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

03.10.1989 US 416335

(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)
2 • **Mao, Simon Jen Tan,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Radioleimatut antikoagulanttipeptidit

Radiomärkta antikoagulantpeptider

Radioleimatut antikoagulanttipeptidit

Käsillä oleva keksintö kohdistuu uusiin radioleimattuihin antikoagulanttipeptideihin (veren hyytymistä estävät peptidit), jotka sellaisenaan ovat arvokkaita reagensseja trombiinin ilmaisemiseksi kehossa tai sopivissa näytteissä diagnostisena kittinä.

Antikoagulantit ovat hyödyllisiä terapeuttisia aineita esimerkiksi akuutin laskimotukoksen, keuhkotulpan, akuutin raajojen valtimotulpan, sydänlihaksen infarktin ja suonensisäisen hyytymän hajottamisen farmakologisessa hoidossa. Antikoagulanttien profylaktisen antamisen uskotaan estävän veritulpan uusiutumista sellaisissa potilaissa, joilla on reumaattinen tai arteriosklerootinen sydänsairaus, sekä estävän tiettyjä tromboembolisia komplikaatioita leikkauksen yhteydessä. Antikoagulanttien antaminen on myös indikoitu sepelvaltimotaudin ja aivo-verisuonitaudin hoidossa. Valtimotukos, erityisesti sydänlihaksen ja aivojen valtimoissa, on yleisin kuoleman aiheuttaja.

Hirudiini on 65 aminohappotähdettä sisältävä polypeptidi, jota eristetään verijuotikkaiden sylkirauhasista. Se on trombiinispesifinen inhibiittori ja siksi sitä voidaan käyttää antikoagulanttisena aineena. Vaikkakin verijuotikkaan uutteista eristetty hirudiini on melko tehokas, sen kliininen käyttö näyttää epätodennäköiseltä sen rajoitetun määrän, kalleuden ja allergisten reaktioiden vuoksi, jotka reaktiot yleensä aiheutuvat minkä tahansa tämän kokoisen vieraan proteiinin antamisesta.

Alunperin hakijat löysivät hirudiinin spesifisen alueen, joka aiheuttaa, ainakin osittain, sen antikoagulanttisen aktiivisuuden. Peptidialue (hirudiinin aminohappotähteet 55 - 65) syntetisoitiin kemiallisesti ja sen osoitettiin sitoutuvan trombiinin tunnistuskohtaan, tunnistuskohdan ollessa avaruudellisesti erilainen kuin entsymaattinen sitoutumiskohta. Synteettisten peptidien si-

toutumisen osoitettiin estävän kompetitiivisesti fibrinogeenin sitoutumista trombiinin tunnistuskohtaan, mikä on tärkeä esiedellytys fibriinin tuotolle ja hyytymän muodostumiselle, ja sen vuoksi näillä peptideillä on merkittävää lääketieteellistä arvoa antikoagulantteina.

Hakijat ovat nyt valmistaneet tiettyä jodityrosiinia ja tämän peptidin radioisotooppisesti leimattuja tyrosiini-johdannaisia. Käsillä oleva keksintö antaa käyttöön menetelmän hirudiini-peptidien leimaamiseksi samalla suojellen sitoutumiskohdassa olevaa aktiivisuutta. Käsillä olevan keksinnön mukaiset jodityrosiini-peptidit ja radioisotooppi-johdannaiset myös säilyttävät niiden parentaaliominaisuudet antikoagulantteina, ja siksi ne voidaan myös hyväksyä tieteellisesti mielenkiintoisiksi ja terapeuttisesti merkittäviksi apuaineiksi. Erityisesti kyky liittää vedyn ja jodin radioaktiivisia isotooppeja peptidiin siten, että peptidin biologinen aktiivisuus säilyy, antaa käyttöön uuden tärkeän reagenssin farmaseuttisessa kokeilussa ja antikoagulanttien käytössä. Sellaisten reagenssien voisi osoittaa olevan tärkeitä eläintutkimuksessa sekä biokemiallisissa tutkimuksissa. esim. radioimmuunimäärityksissä, lääkeagonistien ja -antagonistien skriinauksessa, farmakokineettisissä ja biodistribuutio tutkimuksissa ja diagnostisessa kuvauksessa. Vielä lisäksi jodityrosiinin tai radioisotooppien läsnäolo osoittaa arvonsa lääkkeiden kehittämisessä ja antitromboottisten aineiden testauksessa, ja tällaisilla johdannaisilla voi jo itsessään olla suurempi teho ja pitempi vaikutuksen kestoaika.

Käsillä oleva keksintö kohdistuu seuraavan kaavan mukaisiin peptidijohdannaisiin:

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

jossa

X on aminopään tähde, joka on vety, 1 - 10 hiiliatomia sisältävä yksi tai kaksi alkyyliryhmää, 2 - 10 hiiliatomia sisältävä yksi tai kaksi asyyliryhää, karbobentsyylioksi tai t-butyylioksikarbonyyli;

A_1 on hirudiinin tai sen luonnollisten varianttien sekvenssejä tai niiden osia, sidos, tai se on 1 - 11 mitä tahansa aminohappotähdettä sisältävä peptidi;

A_2 käsittää 0 - 5 seuraavaa tähdettä I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I-Tyr, tai se on L-aromaattinen aminohappo, jos A_9 sisältää radioleimatun aminohapon;

A_3 on Glu, Asp, Ala;

A_4 on mikä tahansa aminohappo;

A_5 on Ile, Val, Leu, Nle, Ala tai Phe;

A_6 on Pro, Hyp, Azt, Pip, DhPro, 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, joka on valittu seuraavista: Tyr, I-Tyr, [^{131}I-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{3}H]-Tyr, Met, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha, His, Ala ja Pro, tai se on dipeptidi, joka sisältää vähintään yhden näistä aminohapoista tai mitä tahansa lipofiilisiä aminohappoja;

A_{10} on hirudiinin tai sen luonnollisten varianttien sekvenssejä tai niiden osia, sidos, tai se on 1 - 11 mitä tahansa aminohappotähdettä sisältävä peptidi;

Y on karboksipään tähde, joka on OH, (C_1-C_8) alkoksi, amino tai mono tai di (C_1-C_4) alkyylisubstituoitu aminohappo;

jotka johdannaiset antikoagulanttisina aineina ovat hyödyllisiä diagnostisessa kuvauksessa, diagnostisessa ilmaisemisessa ja määräntämisessa kitissä, tai antikoagu-

lanttisina aineina, ja ainakin yksi substituentti sisältää radioisotoopin.

Seuraavia yleisiä lyhenteitä käytetään tässä patenttihakemuksessa: (1) aminohapot ja niiden kolmikirjainkoodit, (2) modifioidut ja epätavalliset aminohapot, ja (3) aminopään ja karboksipään substituentit:

(1): AMINOHAPOT JA NIIDEN KOLMIKIRJAINKOODIT

L-AMINOHAPOT	D-AMINOHAPOT
Ala - alaniini	D-Ala - D-alaniini
Arg - arginiini	D-Arg - D-arginiini
Asn - asparagiini	D-Asn - D-asparagiini
Asp - asparagiinihappo	D-Asp - D-asparagiinihappo
Cys - kysteiini	D-Cys - D-kysteiini
Gly - glysiini	
Glu - glutamiinihappo	D-Glu - D-glutamiinihappo
Val - valiini	D-Val - D-valiini
Gln - glutamiini	D-Gln - D-glutamiini
His - histidiini	D-His - D-histidiini
Ile - isoleusiini	D-Ile - D-isoleusiini
Leu - leusiini	D-Leu - D-leusiini
Lys - lysiini	D-Lys - D-lysiini
Phe - fenyylialaniini	D-Phe - D-fenyylialaniini
Met - metioniini	D-Met - D-metioniini
Pro - proliini	D-Pro - D-proliini
Ser - seriini	D-Ser - D-seriini
Thr - treoniini	D-Thr - D-treoniini
Trp - tryptofaani	D-Trp - D-tryptofaani
Tyr - tyrosiini	D-Tyr - D-tyrosiini

(2): MODIFIOIDUT JA EPÄTAVALLISET AMINOHAPOT

Aba	α-amino-n-butyyrihappo
pClPhe	para-kloori-fenyylialaniini
Cha	sykloheksyylialaniini
Chg	sykloheksyyliglysiini
Hyp	hydroksiproliini
I-Tyr	3-jodityrosiini (3-I-Tyr), 5-jodityrosiini (5-I-Tyr), 3,5-dijodityrosiini (3,5-diI-Tyr)
[^{3}H]-Tyr	[3-^{3}H]-tyrosiini([3-^{3}H]-Tyr), [5-^{3}H]-tyrosiini ([5-^{3}H]-Tyr), [3,5-di^{3}H]-tyrosiini ([3,5-di^{3}H]-Tyr)
[^{125}I]-Tyr	[5-^{125}I]-jodityrosiini ([5-^{125}I]-Tyr), [3-^{125}I]-jodityrosiini ([3-^{125}I]-Tyr), [3,5-di^{125}I]-dijodityrosiini ([3,5-di^{125}I]-Tyr)
[^{131}I]-Tyr	[3-^{131}I]-tyrosiini ([3-^{131}I]-Tyr), [5-^{131}I]-tyrosiini ([5-^{131}I]-Tyr), [3,5-di^{131}I]-tyrosiini ([3,5-di^{131}I]-Tyr)
3,5-diI-Tyr	3,5-dijodityrosiini
$_\gamma$MeGlu	D-glutamiinihapon gammametyyliesteri
NMePhe	N-metyylifenyylialaniini
NMePgl	N-metyylifenyyliglysiini
Npa	ß-(naftyyli)alaniini
DhPro	3,4-dihydroproliini
pNO$_2$Phe	para-nitro-fenyylialaniini
pCPhe	para-kloori-fenyylialaniini
Nle	norleusiini
Orn	ornitiini
Pip	pipekolaatti
Pba	p-aminofenyylivoihappo
pSubPhe	para-substituoitu fenyylialaniini
Pgl	fenyyliglysiini
Sar	sarkosiini (N-metyyliglysiini)
SubPhe	orto, meta tai para mono- tai di-substituoitu fenyylialaniini
Tha	ß-(2-tienyyli)-alaniini
Tiq	tetrahydroisokinoliini-3-karboksylaatti

(3) AMINOPÄÄN JA KARBOKSIPÄÄN SUBSTITUENTIT

Ac	asetyyli
Azt	atsetidiini-2-karboksylaatti
Cin	sinnamoyyli
DhCin	3,4-dihydrosinnamoyyli
Glt	glutaryyli
Mal	maleyyli
Oac	8-amino-oktaanihappo
Oct	n-oktyyli
Suc	sukkinyyli
Glt	glutaryyli
Tfa	trifloroasetyyli
#	C-terminaalinen amidi

Seuraavassa esitetään sekvenssiluettelo tunnetun luonnossa esiintyvän aminohapon hirudiinin sekvenssivariaatioista:

SEKVENSSILUETTELO

HIRUDIININ AMINOHAPPOSEKVENSSIN VARIAATIOT

```
1               5                   10
Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys
Ile Thr

15                  20                  25
Leu Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys
                                        Lys

    30                  35                  40
Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly
                   Asn      Lys Gly
                   Gln           Asp
```

45				50				55				
Glu	Gly	Thr	Pro	Lys Asn	Pro	Gln Glu	Ser	His	Asn	Asp	Gly	Asp	Phe

60					65				
Glu	Glu	Ile	Pro	Glu	Glu	Tyr	Leu	Gln	
	Pro			Asp		Asp	Glu		
				(Ala^{63}		Tyr^{64}		Leu/Asp^{65}	Glu^{66})

Luonnossa esiintyvät aminohapot glysiiniä lukuunottamatta sisältävät kiraalisen hiiliatomin. Ellei erikseen toisin ole mainittu, tässä patenttihakemuksessa esitetyt viittaukset optisesti aktiivisiin aminohappoihin tarkoittavat L-konfiguraation omaavia aminohappoja. Esimerkiksi mitkä tahansa A_1-A_{10} ryhmien aminohapoista voivat olla D- tai L-konfiguraation omaavia aminohappoja. Kuten on tavanomaista, tässä hakemuksessa esitettyjen peptidien rakenne on sellainen, että amino-lopetuspää on ketjun vasemmalla puolella ja karboksi-lopetuspää on ketjun oikealla puolella.

Alkoksiryhmän alkyyliryhmän ja alkyyliosan katsotaan käsittävän suorat, haarautuneet tai sykliset alkyyliryhmät, esimerkiksi metyyli-, etyyli-, propyyli-, isopropyyli-, butyyli-, isobutyyli-, tert-butyyli-, pentyyli-, isopentyyli-, sec-pentyyli-, syklopentyyli-, heksyyli-, isoheksyyli-, sykloheksyyli- ja syklopentyylimetyyli-, heptyyli- oktyyli- (Oct), 8-aminooktaanihapporyhmät (Oac). 2-10 hiiliatomia sisältävän asyyliryhmän katsotaan käsittävän suorat, haarautuneet, sykliset, tyydyttyneet ja tyydyttymättömät asyyliryhmät, joissa on 1 tai 2 karbonyyliosaa per ryhmä, esimerkiksi seuraavat ryhmät: asetyyli (Ac), atsetidiini-2-karboksylaatti (Azt), bentsoyyli sukkinyyli, sinnamoyyli (Cin), DhCin, maleyyli (Mal) ja glutaryyli (Glt). Sekä alkyyli- että asyylisubstituenttien katsotaan käsittävän ne halogeenisubstituoidut ryhmät,

joissa halogeeniryhmä on fluori, kloori, bromi tai jodi, esimerkiksi trifluoriasetyyli (Tfa).

Termin "mikä tahansa aminohappo" tässä hakemuksessa käytettynä ei tarkoiteta sisältävän minkä tahansa karboksyylihapon, jolla on aminosubstituentti, vaan pikemminkin tätä termiä käytetään siten, kuin polypeptidijohdannaisia tutkivat alan ammattimiehet sitä tavanomaisesti käyttävät, ja siten tämä termi käsittää luonnossa esiintyvät aminohapot samoin kuin muut "ei-proteiini" α-aminohapot, joita tavanomaisesti käyttävät ne peptidikemian ammattimiehet, jotka valmistavat luonnossa esiintyvien peptidien synteettisiä analogeja. Luonnossa esiintyvät aminohapot ovat "L-aminohappoja" glysiini, alaniini, valiini, leusiini, isoleusiini, seriini, metioniini, treoniini, fenyylialaniini, tyrosiini, tryptofaani, kysteiini, proliini, histidiini, asparagiinihappo, asparagiini, glutamiinihappo, glutamiini, arginiini, ornitiini ja lysiini. "Mikä tahansa aminohappo" käsittää myös luonnossa esiintyvien aminohappojen D-aminohapot (D-isomeerit), D-alaniini, D-valiini, D-leusiini, D-isoleusiini, D-seriini, D-metioniini, D-treoniini, D-fenyylialaniini, D-tyrosiini, D-tryptofaani, D-kysteiini, D-proliini, D-histidiini, D-asparagiinihappo, D-asparagiini, D-glutamiinihappo, D-glutamiini, D-arginiini. Termiin sisältyvät myös "ei-proteiini" α-aminohapot, joista esimerkkejä ovat norleusiini, norvaliini, alloisoleusiini, homoarginiini, tiaproliini, dihydroproliini, hydroksiproliini (Hyp), homoseriini, sykloheksyyliglysiini (Chg), α-amino-n-voihappo (Aba), sykloheksyylialaniini (Cha), aminofenyylivoihappo (Pba), orto- meta- tai para-asemassa mono- tai disubstituoidut fenyylialaniinit, kuten para-substituoitu fenyylialaniini (pSubPhe) ja para-kloori-fenyylialaniini ja para-nitrofenyylialaniini (pNPhe), tai fenyyliosan asemat, joissa on yksi tai kaksi seuraavista: (C_1-C_4) alkyyli, (C_1-C_4) alkoksi, halogeeni tai nitro-ryhmät tai substi-

tuoitu metyleenidioksi-ryhmällä, ß-2-, ja 3-tienyylialaniini, ß-2- ja 3-furanyylialaniini, ß-2-, 3- ja 4-pyridyylialaniini, ß-(bentsotienyyli-2- ja 3-yyli)alaniini, ß-(1- ja 2-naftyyli)alaniini (Npa), seriinin, treoniinin tai tyrosiinin O-alkyloidut johdannaiset, glutamiinihapon ja asparagiinihapon metyyliesterit, S-alkyloitu kysteiini, tyrosiinin O-sulfaattiesteri, ja halogenoidut tyrosiinit, kuten 3-jodityrosiini, 5-jodityrosiini ja 3,5-dijodityrosiini.

Ilmaisu "radioleimattu aminohappo" käsittää 3-[H^3]-tyrosiinin, 5-[H^3]-tyrosiinin, 3-[I^{125}]-jodityrosiinin, 5-[I^{125}]-jodityrosiinin, 3,5-[I^{125}]-dijodityrosiinin, 3-[I^{131}]-jodityrosiinin, 5-[I^{131}]-jodityrosiinin, 3,5-[I^{131}]-dijodityrosiinin. Ilmaisulla "hirudiinin tai sen luonnollisten varianttien sekvenssit" hakijat tarkoittavat sitä, että sovelletaan luonnossa esiintyviä hirudiinin aminohapposekvenssejä.

Termillä "niiden osat" hirudiinin ja sen varianttien yhteydessä käytettynä tarkoitetaan niiden sisältävän vähintään 4 aminohapon peräkkäisen alueen, joka on johdettu hirudiinin tai sen varianttien sekvenssistä.

Termi "lipofiilinen aminohappo" käsittää aminohapot Tyr, Phe, Leu, Met, Nle, Ile, Val ja Pro. Termin "L-aromaattinen aminohappo" tarkoitetaan sisältävän tyrosiinin ja fenyylialaniinin, ja aromaattisen renkaan sisältävät aminohapot.

Ilmaisulla "1-11 minkä tahansa aminohapon tähdettä sisältävä peptidi" tarkoitetaan sitä, että aminohappojen lisäys välillä olevien aminohappojen (A_2-A_9) joko amino- tai karboksipäähän käsittää välillä olevan rakenteen luontaisen aktiivisuuden.

Ilmaisun I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, [^{125}I]-Tyr 0 - 5 tähdettä tarkoitetaan käsittävän sekvenssin, joka sisältää 1 - 5 tähdettä mistä tahansa aminohaposta, joka sisältää I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr tai [^{131}I]-Tyr yksin- tai monin-

kertaisesti tai yhdessä minkä tahansa muun aminohapon kanssa. I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-Tyr määritelmään kuuluvat myös vastaavat asema-analogit, kuten 3-jodityrosiini, 5-jodityrosiini, 3,5-dijodityrosiini,[3-^{3}H]-tyrosiini, [5-^{3}H]-tyrosiini, [3,5-di^{3}H]-tyrosiini, [3-^{125}I]-jodityrosiini, [5-^{125}I]-jodityrosiini,[3,5-di^{125}I]-dijodityrosiini, [3-^{131}I]-tyrosiini, [5-^{131}I]-tyrosiini, [3,5-di^{131}I]-tyrosiini. Esimerkkinä sellaisesta sekvenssistä, joka sisältää 1 - 5 tähdettä mistä tahansa aminohaposta, joka sisältää I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr tai [^{131}I]-Tyr yksin- tai moninkertaisesti tai yhdessä minkä tahansa muun aminohapon kanssa on

Suc I-Tyr I-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha $_{\gamma}$MeGlu

(esimerkki 3) tai aminohappojen insertio ITyr ITyr dipeptidisekvenssiä ennen, niiden välissä tai jälkeen tai mikä tahansa niiden kombinaatio.

Muita esimerkkejä käsillä olevan keksinnön mukaisista radioleimatuista molekyyleistä, jotka voivat olla liittyneinä hirudiiniin, ovat radiohalogenoidut molekyylit. Radiohalogeenit, jotka ovat hyödyllisiä diagnostisessa kuvantamisessa, käsittävät, mutta ne eivät ole rajoittuneet yhdisteisiin ^{125}I ja ^{123}I potilaan kuvaamisessa gammakameralla, ja ^{18}F, ^{75}Br tai ^{76}Br positronitomografisessa kuvantamisessa.

Kaavan I mukaisista polypeptideistä voidaan muodostaa farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja minkä tahansa ei-toksisen, orgaanisen tai epäorgaanisen hapon kanssa. Esimerkkejä epäorgaanisista hapoista, jotka muodostavat sopivia suoloja, ovat suolahappo, vetybromihappo, rikkihappo ja fosforihappo ja happometallisuolat, kuten natriummonovetyortofosfaatti ja kaliumvetysulfaatti. Esimerkkejä orgaanisista hapoista, jotka muodostavat sopivia suoloja, ovat mono-, di- tai trikarboksyylihapot.

Esimerkkejä tällaisista hapoista ovat etikkahappo, glykolihappo, maitohappo, palorypälehappo, malonihappo, meripihkahappo, glutaarihappo, fumaarihappo, omenahappo, viinihappo, sitruunahappo, askorbiinihappo, maleiinihappo, hydroksimaleiinihappo, bentsoehappo, hydroksibentsoehappo, fenyylietikkahappo, kanelihappo, salisyylihappo, 2-fenoksibentsoehappo ja sulfonihapot, kuten metaanisulfonihappo ja 2-hydroksietaanisulfonihappo. Karboksipään aminohappo-osan suolat käsittävät myrkyttömien karboksyylihappojen suolat, jotka ovat muodostuneet minkä tahansa sopivien epäorgaanisten tai orgaanisten emästen kanssa. Nämä suolat käsittävät alkalimetallit, kuten esimerkiksi natrium ja kalium, maa-alkalimetallit, kuten kalsium ja magnesium, ryhmän IIIA kevyet metallit käsittäen alumiinin, ja orgaaniset primaariset, sekundääriset ja tertiääriset amiinit, kuten esimerkiksi trialkyyliamiinit, sisältäen trietyyliamiinin, prokaiini, dibentsyyliamiini, 1-eteeniamiini, N,N'-dibentsyylietyleenidiamiini, dihydroabietyyliamiini, N-(alempi)alkyylipiperidiini, ja mikä tahansa muu sopiva amiini.

Kemiallisten yhdisteiden geneerisenä ryhmänä tietyt ryhmät ovat edullisia. Hakijoiden mielestä edullisia peptidijohdannaisia ovat ne kaavan I mukaiset yhdisteet, joissa

X vety, asetyyli tai sukkinyyli;

A_1 on hirudiinin tai sen luonnollisten varianttien sekvenssejä sisältäen aminohapot 1 - 54 tai niiden alueen, tai se on sidos;

A_2 käsittää 1 - 5 seuraavaa tähdettä I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I-Tyr, tai se on Trp, Glu, His, Leu, Phe, D-Phe, SubPhe, NMePhe, Tha, 3,4-DhCin, Cin, Nap, ß-(2- ja 3-tienyyli)alaniini, ß-(2- ja 3-furanyyli)alaniini, ß-(2-, 3- ja 4-pyridyyli)alaniini, ß-(bentsotienyyli-2- ja 3-yylialaniini tai ß-(1- ja 2-naftyyli)alaniini;

A_3 on Glu, Ala;

A_4 on Glu, Asp, Pro tai Ala, Azt tai Pip;

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 I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, tai Tyr, Ala, Pro, Cha, tai se on dipeptidi Ala-Tyr, Tyr-Leu, Ala-Phe, Tyr-Tyr, Ala-leu, Tyr-Ala, Glu-Leu, D-Tyr-Leu, Leu-Phe, Sar-Cha, Pro-Cha, Cha-Leu, Ala-Cha, Tyr-Cha;

A_{10} on sidos, tai $_\gamma$MeGlu, Glu, D-Glu, Asn, D-Asn, Pro, Gln, Ala, Lys, D-Lys, Asp, Orn, Asp tai Ala; ja

Y on karboksipään tähde, joka on OH, (C_1-C_8) alkoksi, amino, mono tai di (C_1-C_4) alkyylisubstituoitu aminohappo.

Erityisen edullisia kaavan I mukaisia peptidijohdannaisia ovat ne, joissa:

X on sukkinyyli;

A_1 on sidos;

A_2 on I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-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 Ala-Cha;

A_{10} on $_\gamma$MeGlu; ja

Y on OH.

Synteesi:

Käsillä olevan keksinnön mukaiset proteiinit voidaan valmistaa useilla ammattimiesten sinänsä tuntemilla menetelmillä. Tällaiset menetelmät käsittävät liuosfaasipeptidisynteesin, kiinteän faasin jaksottaisen ja lohkosynteesin, geenikloonauksen ja näiden tekniikoiden kombinaatiot. Kiinteän faasin sekventiaalinen menetelmä voidaan toteuttaa käyttämällä automaattisia menetelmiä, kuten käyttämällä automaattista peptidisyntetisaattoria. Tässä menetelmässä peptidit laitetaan hartsille alkaen C-päästä, suojatusta aminohaposta. Käytetty hartsialusta voi olla mikä tahansa sopiva hartsi, jota on perinteisesti käytetty polypeptidien kiinteän faasin valmistuksessa, edullisesti se on polystyreeni, joka on ristisidottu 0,5 - noin 3 prosenttisella divinyylibentseenillä, joka on joko kloorimetyloitu tai hydroksimetyloitu, jolloin saadaan kohtia esterin muodostumiselle alussa esitetyn α-amino suojatun aminohapon kanssa. C-pään amideihin voidaan käyttää primetyylibentsyylihydroksyyliamiini-hartsia. Sekvenssin kytkennän lopettamisen jälkeen joko Boc-suojaryhmä jäi paikoilleen tai se poistettiin ja N-pään aminoryhmä asyloitiin. Suojafragmentin korvaaminen hartsista suoritettiin käyttämällä sopivaa aminoalkoholia.

Esimerkin hydroksimetyyli-hartsista ovat kuvanneet Bodanszky et al., Chem.Ind. (London) 38 (1966) 1597 - 1598. Kloorimetyloitu hartsi on kaupallisesti saatavana yhtiöstä Bio Rad Laboratories, Richmond, Califonia, ja tällaista hartsivalmistetta ovat kuvanneet Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco 1969), luku 1, ss. 1 - 6. Suojattu aminohappo voi olla sitoutuneena hartsiin Gisinin menetelmällä, Helv. Chem.Acta, 56 (1973) 1476. Monet hartsiin sidotut, suojatut aminohapot ovat kaupallisesti saatavissa. Esimerkiksi käsillä olevan keksinnön mukaisen polypeptidin valmistamiseksi, jolloin karboksipää on $_{\gamma}$MeGlu tähde, voidaan

käyttää tert-butyylioksikarbonyyli (Boc) suojattua $_{\gamma}$MeGlu:a sidottuna bentsyloituun, hydroksimetyloituun fenyyliaset-amidometyylihartsiin (PAM).

α-amino suojatun aminohapon hartsiin kytkemisen jälkeen suojaryhmä poistetaan käyttämällä mitä tahansa sopivaa menetelmää, kuten käyttämällä trifluorietikkahappoa metyleenikloridissa, trifluorietikkahappoa yksin tai suolahappoa dioksaanissa. Suojaryhmän poisto tapahtuu lämpötilassa 0°C - huoneenlämpö. Muitakin α-amino suojaryhmiä poistavia reagensseja ja olosuhteita spesifisen α-amino suojaryhmien poistamiseksi voidaan käyttää. α-amino suojaryhmän poistamisen jälkeen toisia amino-suojattuja aminohappoja kytketään asteittain haluttuun järjestykseen. Vaihtoehtoisesti useita aminohappo-ryhmiä voidaan kytkeä liuosmenetelmällä ennen hartsiin tuetun aminohapposekvenssin kytkemistä.

α-amino suojaryhmä, jota käytetään kunkin polypeptidisekvenssiin sijoitetun aminohapon kanssa, voi olla mikä tahansa sinänsä tunnettu suojaryhmä. Tutkittavien α-amino suojaryhmien luokkia ovat (1) asyyli-tyyppiset suojaryhmät, kuten formyyli, trifluoriasetyyli, ptalyyli, tolueenisulfonyyli (tosyyli), bentseenisulfonyyli, nitrofenyylisulfenyyli, trityylisulfenyyli, o-nitrofenoksiasetyyli ja α-klooributyryyli; (2) aromaattiset uretaani-tyyppiset suojaryhmät, kuten bentsyylioksikarbonyyli ja substituoitu bentsyylioksikarbonyyli, kuten p-klooribentsyylioksikarbonyyli, p-nitrobentsyylikarbonyyli, p-bromibentsyylioksikarbonyyli, p-metoksibentsyylioksikarbonyyli, 1-p-bifenylyyli)-1-metyylietoksikarbonyyli, α,α-dimetyyli-3,5-dimetoksibentsyylioksikarbonyyli ja bentshydryylioksikarbonyyli; (3) alifaattiset uretaani suojaryhmät, kuten tert-butyylioksikarbonyyli (Boc), di-isopropyylimetoksikarbonyyli, isopropyylioksikarbonyyli, etoksikarbonyyli ja allyylioksikarbonyyli; (4) sykloalkyyli uretaani-tyyppiset suojaryhmät, kuten syklopentyylioksikarbonyy-

li, adamantyylioksikarbonyyli ja sykloheksyylioksikarbonyyli; (5) tiouretaani-tyyppiset suojaryhmät, kuten fenyylitiokarbonyyli; ja (6) alkyyli-tyyppiset suojaryhmät, kuten trifenyylimetyyli (trityyli) ja bentsyyli. Edullinen α-amino suojaryhmä on tert-butyylioksikarbonyyli.

Kuten kiinteäfaasipeptidisynteesistä on tunnettua, monilla aminohapoilla on toimintoja, jotka vaativat suojausta ketjun preparoinnin aikana. Sopivan suojaryhmän käyttämisen ja valinnan kykenevät alan ammattimiehet tekemään ja nämä riippuvat suojattavasta aminohaposta ja muiden suojattujen aminohappotähteiden läsnäolosta peptidissä. Tällaisen sivuketjusuojaryhmän valinta on ratkaisevaa siinä, että täytyy olla yksi, jota ei poisteta katkaisemalla α-amino-puolikkaan suojaryhmän lohkaisussa. Esimerkiksi sopivia sivuketjusuojaryhmiä lysiinille ovat bentsyylioksikarbonyyli ja substituoitu bentsyylioksikarbonyyli, jolloin mainittu substituentti on valittu seuraavista: halo (esim. kloori, bromi, fluori) ja nitro (esim. 2-klooribentsyylioksikarbonyyli, p-nitrobentsyylioksikarbonyyli, 3,4-diklooribentsyylioksikarbonyyli) tosyyli, t-amyylioksikarbonyyli, t-butyylioksikarbonyyli ja di-isopropyylimetoksikarbonyyli. Alkoholinen treoniinin ja seriinin hydroksyyli-ryhmä voidaan suojata asetyyli-, bentsoyyli-, tert-butyyli-, trityyli-, bentsyyli-, 2,6-diklooribentsyyli- tai bentsyylioksikarbonyyli-ryhmällä. Edullinen suojaryhmä on bentsyyli.

Sopivan kytkentäreagenssin valinnan pystyvät alan ammattimiehet tekemään. Erityisen sopivia kytkentäreagensseja, joihin lisättävä aminohappo on Gln, Asn tai Arg, ovat N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidi ja 1-hydroksibentsotriatsoli. Näiden reagenssien käyttö estää nitriilin ja laktaamin muodostumisen. Muita kytkentäreagensseja ovat (1) karbodi-imidit (esim. N,N'-disykloheksyylikarbodi-imidi ja N-etyyli-N'-(γ-dimetyyliaminopropyylikarbodi-imidi); (2) syanamidit (esim. N,N-dibentsyylisyanamidi);

(3) keteeni-iminit; (4) isoksatsolium-suolat (esim. N-etyyli-5-fenyyli-isoksatsolium-3'-sulfonaatti; (5) monosyklinen typpi, joka sisältää aromaattisen luonteen omaavia heterosyklisiä amideja sisältäen 1-4 typpeä renkaassa, kuten imidatsolit, pyratsolidit ja 1,2,4-triatsolidit. Spesifisiä, hyödyllisiä heterosyklisiä amideja ovat N,N'-karbonyylidi-imidatsoli ja N,N-karbonyyli-di-1,2,4-triatsoli; (6) alkoksyloitu asetyleeni (esim. etoksiasetyleeni); (7) reagenssit, jotka muodostavat seka-anhydridin aminohapon karboksyyli-osan kanssa (esim. etyylikloori-formaatti ja isobutyylikloori-formaatti) tai kytkettävän aminohapon symmetrinen anhydridi (esim. Boc-Ala-O-Ala-Boc), (8) typpeä sisältävät heterosykliset yhdisteet, joissa on yhdessä rengastypessä hydroksi-ryhmä (esim. N-hydroksiftaali-imidi, N-hydroksisukkiini-imidi ja 1-hydroksibentsotriatsoli) ja (9) Castron reagenssi (BOP). Muita aktivoivia reagensseja ja niiden käyttöä peptidien kytkennässä on Kapoor kuvannut julkaisussa J.Pharm.Sci. 59 (1970) 1 - 27. Hakijat pitävät edullisena symmetrisen anhydridin käyttöä kytkentäreagenssina kaikille muille aminohapoille paitsi aminohapoille Arg, Asn ja Gln.

Kutakin suojattua aminohappoa tai aminohapposekvenssiä laitetaan kiinteäfaasireaktoriin noin nelinkertainen määrä ja kytkentä suoritetaan dimetyyliformamidi:metyleenikloridi (1:1) alustassa tai pelkästään dimetyyliformamidissa tai edullisesti pelkästään metyleenikloridissa. Niissä tapauksissa, joissa esiintyy epätäydellistä kytkentää, kytkentämenetelmä toistetaan ennen α-aminosuojaryhmän poistoa, ennen seuraavan aminohapon kytkentää kiinteäfaasireaktorissa. Kytkentäreaktion onnistumista kussakin synteesin vaiheessa tutkitaan ninhydriini-reaktiolla, kuten E. Kaiser et al. ovat kuvanneet julkaisussa Analyt.Biochem. 34 (1970) 595.

α-amino-suojatun aminohapon hartsi-kantajaan kytkemisen jälkeen suojaryhmä poistetaan käyttämällä mitä

tahansa sopivaa menetelmää, kuten käyttämällä trifluorietikkahappoa metyleenikloridissa, pelkästään trifluorietikkahappoa tai suolahappoa dioksaanissa. Suojaryhmän poisto tapahtuu lämpötilassa 0°C - huoneenlämpö. Muitakin α-amino suojaryhmiä poistavia reagensseja ja olosuhteita spesifisen α-amino suojaryhmien poistamiseksi voidaan käyttää. α-amino suojaryhmän poistamisen jälkeen toisia amino-suojattuja aminohappoja kytketään asteittain halutuun järjestykseen. Vaihtoehtoisesti useita aminohappo-ryhmiä voidaan kytkeä liuosmenetelmällä ennen hartsiin tuetun aminohapposekvenssin kytkemistä.

Halutun aminohapposekvenssin saamisen jälkeen peptidi poistetaan hartsista ja suojaus poistetaan. Tämä voidaan tehdä hydrolyysillä, kuten hartsiin sidotun polypeptidin käsittely vedettömällä neste HF:lla puhdistavan lisäaineen (kuten anisolin) läsnäollessa. Tyypillisesti suojaryhmän poisto tehdään sen jälkeen, kun peptidiketjusynteesi on valmis, mutta suojaryhmät voidaan poistaa minä muuna sopivana aikana tahansa.

Suojaryhmättömän peptidin puhdistus ja analyysi voidaan suorittaa usealla vakiomenetelmällä. Sopivan puhdistus- ja analyysimenetelmän valinnan pystyy alan ammattimies tekemään. Sopiva puhdistusmenetelmä on preparatiivinen HPLC. Puhtaiden peptidien analyysi voidaan suorittaa analyyttisellä HPLC:lla, aminohappoanalyysillä, nopealla atomipommitusmassaspektrometrillä ja millä tahansa muulla sopivalla analyysimenetelmällä.

Radio-leimatut peptidit

Käsillä olevan keksinnön mukaiset radio-leimatut peptidit ovat hyödyllisiä trombiinin ja trombiini-kompleksien in vitro ja in vivo määrityksissä tutkimuksessa ja terapiassa, tai ne ovat hyödyllisiä analysoinnissa tai diagnostisissa kiteissä, radio-leimattujen trombiiniin sitoutuvien aineiden valmistuksessa. Eräs käsillä olevan keksinnön mukainen suoritusmuoto on trombiinia sitovien

peptidien radio-leimaus, joka myös vähentää tai eliminoi trombiinin trombolyyttistä (veritukkoja hajottava) aktiivisuutta, joka voi toimia tällaista kompleksien stabiloijana. Esimerkki tästä voisi olla hyytymään liittyvän veritukkeuman radiokuvaus. Leimatun hirudiini-peptidin sitoutuminen trombiiniin sallisi veritukkeuman paikallistamisen ja jakautumisen radiokuvaus-tekniikalla.

Peptidien radiojodaus tehdään yleensä käyttämällä kloramiini T -menetelmää. Vaihtoehtoisia menetelmiä kloramiini T -menetelmälle peptidien leimaamiseksi ovat (1) jodimonokloridi-menetelmä, (2) vaihtoehtoiset kemialliset hapetusmenetelmät, (3) elektrolyyttinen jodaus ja (4) entsymaattiset jodaus-menetelmät. Vaihtoehtoisesti (5) konjugaatioleimaus-menetelmät proteiinien ja polypeptidien jodaamiseksi tuntevat alan ammattimiehet hyvin, ja menetelmässä käytetään N-sukkiini-imidyyli 3-(4-hydroksi-5-[125I]jodifenyyli)propionaattia (Bolton-Hunter reagenssi), tai jokin muu sopiva leimausmenetelmä. Esimerkiksi metyyli-p-hydroksibentsimidaattihydrokloridia on käytetty jodaavana reagenssina, kuten myös radiojodattuja diatsotoituja aniliineja. Jodattujen peptidien muuntaminen tritiumia sisältäviksi peptideiksi voidaan suorittaa käyttämällä katalyyttista pelkistystä palladiumoksidilla ja tritium-kaasulla.

Terapeuttinen käyttö

Käsillä olevan keksinnön mukaisen peptidijohdannaisen antikoagulanttiannos on 0,2 - 250 mg painokiloa kohden päivässä riippuen potilaasta, hoidettavan tromboottisen tilan vakavuudesta ja valitusta peptidijohdannaisesta. Tietyn potilaan sopiva annos voidaan määrittää helposti. Edullisesti 1 - 4 päivittäistä annosta voidaan antaa tyypillisesti annoksissa, joissa kussakin on 5 - 100 mg aktiivista yhdistettä. Käsillä olevan keksinnön mukaisen peptidin määrän, joka inhiboi tai estää veren koaguloitumisen ekstrakorporeaalisessa alustassa, kuten

esimerkiksi varastoidussa koko veressä, osaavat alan ammattimiehet määrittää helposti.

Antikoagulanttihoitoa käytetään useiden trombootTisten tilojen hoidossa ja estämisessä, erityisesti sepelvaltimo- ja aivoverisuonisairauksissa. Tälle alalle erikoistuneet ymmärtävät helposti ne hoitotapaukset, jotka vaativat antikoagulanttihoitoa. Termillä "potilas" tässä patenttihakemuksessa käytettynä tarkoitetaan nisäkkäitä, kuten kädellisiä, käsittäen ihmiset, lampaat, hevoset, karjan, siat, koirat, kissat, rotat ja hiiret. Veren koaguloitumisen estäminen on hyödyllistä paitsi yksilöiden antikoagulanttihoidossa mutta myös aina kun veren koaguloitumisen estämistä halutaan, kuten esimerkiksi varastoidun koko veren koaguloitumisen estämisessa ja muiden testinäytteiden tai varastoitavien biologisten näytteiden koaguloitumisen estämisessä.

Vaikkakin jotkut peptidijohdannaisista saattavat selvittää matkansa suolen läpi oraalisen (suun kautta) antamisen jälkeen, hakijat pitävät edullisempana non-oraalista antoa, esimerkiksi subkutaanista (ihonalainen), intravenoosistä (laskimonsisäinen), intramuskulaarista (lihaksensisäinen) tai intraperitoneaalista (vatsaontelon sisäinen) antoa; lääkkeen antaminen pitkävaikutteisena injektiona, implantti-valmisteena tai antamalla lääke suoraan limakalvolle, kuten nenän, kurkun ja keuhkoputken limakalvolle, esimerkiksi aerosolissa, voi käsillä olevan keksinnön mukainen peptidijohdannainen olla sprayn tai kuivan pulverin muodossa.

Parenteraalisessa annossa yhdisteitä voidaan antaa liuoksen tai suspension injektoitavina annoksina fysiologisesti hyväksyttävässä laimentimessa farmaseuttisen kantajan kanssa, joka kantaja voi olla steriili liuos, kuten vesi ja öljyt, yksin tai yhdessä pinta-aktiivisen aineen tai muiden farmaseuttisesti hyväksyttävien lisäaineiden kanssa. Esimerkkejä öljyistä, joita voidaan käyttää kä-

sillä olevan keksinnön mukaisissa valmisteissa, ovat maaöljy, eläinöljyt, kasvisöljyt tai synteettiset öljyt, esimerkiksi maapähkinäöljy, soijaäljy ja mineraaliöljy. Yleensä edullisia liuoskantajia, erityisesti injektoitavissa liuoksissa, ovat vesi, suolaliuos, vesipitoinen dekstroosi ja vastaavat sokeriliuokset, etanoli ja glykolit, kuten propyleeniglykoli tai polyetyleeniglykoli.

Yhdisteitä voidaan antaa pitkävaikutteisen injektion tai implantaatti-valmisteen muodossa, joita voidaan formuloida sellaisella tavalla, että aktiivista ainetta vapautuu jatkuvasti. Aktiivinen ainesosa voidaan puristaa pelleteiksi tai pieniksi sylintereiksi, jotka istutetaan subkutaanisesti tai intramuskulaarisesti pitkävaikutteisina injektioina tai implantaatteina. Implantaateissa voidaan käyttää inerttejä materiaaleja, kuten biologisesti hajoavia polymeerejä tai synteettisiä silikoneja, esimerkiksi Dow-Corning Corporation-yhtiön valmistamaa silikonikumia, Silastic.

Käsillä olevaa keksintöä kuvataan lähemmin seuraavilla esimerkeillä, jotka eivät kuitenkaan rajoita keksintöä.

Esimerkki 1

Suc 3,5-di-I-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu:n synteesi

Suc 3,5-di-I-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu syntetisoitiin kiinteäfaasimenetelmillä ABI 430A peptidisyntetisaattorilla. Nα-Boc suojattujen aminohappojen ennalta muodostetut symmetriset anhydridit lisättiin sekventiaalisesti Boc-glu (Bzl) Merrifield hartsiin (0,34 meq/g) käyttäen ABI:n esittämää kaksoiskytkentämenetelmää. Seuraavaa sivuketjun suojausta käytettiin: 3,5-diI-Tyr (3-Br-Bzl); Glu (Bzl). Hartsiin sidotun peptidin N-pään sukkinylaatio suoritettiin sukkiinianhydridillä.

Peptidi poistettiin hartsista vedettömällä HF:lla 0°C:ssa, 30 minuuttia, anisolin läsnäollessa. Peptidi uu-

tettiin 5 % HoAc:lla, vedellä, 30% CH_3CN:lla ja lyofilisoitiin. Lyofilisaatti puhdistettiin käänteisfaasi H-PLC:lla käyttäen Beckman Ultraprep C-18 kolonnia (50,8 x 150 mm), 80 ml/min, 30-40% CH_3CN/vesipitoinen TFA -gradientilla.

Hirudiinipeptidien suora jodaus suoritettiin N-a[^{125}I]:lla. Yleensä 50 µg hirudiinipeptidiä (2 mg/ml) 0,5 M natriumfosfaatissa (pH 7,5) jodattiin lisäämällä 10 µl kloramiini-T:ä (1,25 mg(ml 0,5 M fosfaattipuskurissa). Tämän reaktion annettiin jatkua 30 s 24°C:ssa. Sitten reaktio lopetettiin lisäämällä 25 µl natriummetabisulfiittia (1,25 mg/ml 0,5 M fosfaattipuskurissa). Jodausreaktio laitettiin välittömästi Bio-Gel P-2 kolonniin (2,6 x 50 cm), joka oli tasapainotettu 0,1 M natriumboraattipuskurilla, pH 8,5. Lähes 85 % [^{125}I] molekyyleistä siirtyi proteiiniin määritettynä kolonnikromatografisesti. Sitten leimatut hirudiinipeptidit lisättiin välittömästi 1 %:seen naudan seerumin albumiiniin, 0,1 M natriumboraattipuskuriin (1:1) ja niitä säilytettiin -20°C:ssa useissa lääkepulloissa. Juuri sulatettua leimattua hirudiininäytettä käytetään sitten kutakin koetta kohden. Varastoinnin jälkeen leimattujen hirudiinipeptidien uudelleen kromatografiointi TKS-3000 HPLC-kolonnissa antoi tulokseksi yhden ainoan radioaktiivisuushuipun, joka on yhtäpitävä leimaamattomien hirudiinipeptidien eluutioprofiilin kanssa.

Hirudiinipeptidit tritioitiin katalyyttisellä pelkistyksellä. 15 mg peptidiä suspendoitiin 2 ml:aan vettä ja 30 µl:aan trietyyliamiinia. Tähän liuokseen lisättiin 30 µg platina-alumiinioksidia. Atmosfäärinen pelkistys suoritettiin huoneenlämmössä 1 tunnin ajan. Aluksi reaktiot pestiin suodattimilla vedellä jäljelle jääneiden leimausten poistamiseksi, ja jäljelle jäänyt raaka materiaali eristettiin uudellen (katso Dupont-NEN Research Catalog sivu 22, Cat. #8259, Catalytic Reduction with platium oxide).

Puhtaiden leimattujen peptidien analyysi antoi halutun molekyyli-ionihuipun FAB-MS:llä ja näiden peptidien aminohappoanalyysi oli vastaava kuin halutulla peptidillä. Tällä tavoin seuraavilla peptideillä on fyysiset ominaisuudet, jotka on spesifioitu alempana.

Näytteet testattiin trombiini-indusoidulla fibriinihyytymän inhibitioanalyysillä. Kaikki analyysin liuokset tehtiin analyysipuskuriin, joka sisälsi 0,12 M natriumkloridia, 0,01 M natriumfosfaattia, 0,01 % natriumatsidia ja 0,1 % naudan seerumin albumiinia, pH 7,4. Naudan trombiini titrattiin sopivaan pitoisuuteen niin, että fibriinihyytymän muodostumista voitiin seurata mikrotiitterilevyosoittimesta (Bio-Tek EL 309 = 60 minuutin aikana aallonpituudella 405 nm. Tämä trombiiniliuos (50 µl; 0,2 pmol) lisättiin mikrotiitterilevyn kaivoihin, jotka sisälsivät 50 µl testattavan synteettisen peptidin liuosta. Yhden minuutin ravistamisen ja vielä 10 minuutin inkuboinnin jälkeen 24°C:ssa liuokseen lisättiin 100 µl laimennettua plasmaa (1:10) 0,1% EDTA:ssa ja pyöritettiin 20 s. Liuoksen sameutta tarkasteltiin automaattisella lukijalla 5 minuutin välein. IC_{50} lasketaan tuloksista ja se määritetään sinä peptidin pitoisuutena, joka johti 50 %:n tarkkailtavan liuoksen sameuteen suhteessa kontrolliin, joka ei sisältänyt inhibiittoria. Tämä on vastaava kaksinkertaisen lisäyksen kanssa fibriinihyytymän muodostumisajassa. Analyyseissa, joissa käytettiin ihmisen tai naudan trombiinia, trombiini titrattiin pitoisuuksiin, jotka tuottivat fibriinihyytymää samalla nopeudella 30 minuutin ajan. Tällä tavoin seuraaville peptideille on ilmoitettu biologisia ominaisuuksia esimerkeissä, jotka on spesifioitu alla; + tarkoittaa IC_{50}-arvoa 25-200 µM, ja ++ tarkoittaa IC_{50} < 25 µM, nt tarkoittaa "ei määritetty".

1. Suc 3,5-diI-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu
MP 1582 FAB-MS $(MH)^+$ 1581
Aminohappoanalyysi:

Z (4)	Pro (2)	Ile (1)	Tyr (1)	Ala (1)
4,09	1,96	0,96	0,98	0,99

In vitro voimakkuus: ++

2. Suc [^{3}H]-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu
MP 1995 FAB-MS $(MH)^+$ 1996,3
leimaus ja analyysi verrattu NEN:n
In vitro voimakkuus: nt.

3. Suc 3,5-diI-Tyr 3,5-diI-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu
MP 1995 FAB-MS $(MH)^+$ 1996,3
Aminohappoanalyysi:

Z (4)	Pro (2)	Ile (1)	Tyr (2)	Ala (1)
4,09	1,96	0,96	1,95	0,99

In vitro voimakkuus: ++

Patenttivaatimukset:

1. Radioleimattu seuraavan kaavan mukainen peptidijohdannainen

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

jossa

X on aminopään tähde, joka on vety, 1 - 10 hiiliatomia sisältävä yksi tai kaksi alkyyliryhmää, 2 - 10 hiiliatomia sisältävä yksi tai kaksi asyyliryhää, karbobentsyylioksi tai t-butyylioksikarbonyyli;

A_1 on hirudiinin tai sen luonnollisten varianttien sekvenssejä tai niiden osia, sidos, tai se on 1 - 11 mitä tahansa aminohappotähdettä sisältävä peptidi;

A_2 käsittää 0 - 5 seuraavaa tähdettä I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, tai se on L-aromaattinen aminohappo, jos A_9 sisältää radioleimatun aminohapon;

A_3 on Glu, Asp, Ala;

A_4 on mikä tahansa aminohappo;

A_5 on Ile, Val, Leu, Nle, Ala tai Phe;

A_6 on Pro, Hyp, Azt, Pip, DhPro, 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, joka on valittu seuraavista: Tyr, I-Tyr, [^{131}I]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{3}H]-Tyr, Met, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha, His, Ala ja Pro, tai se on dipeptidi, joka sisältää vähintään yhden näistä aminohapoista tai mitä tahansa lipofiilisiä aminohappoja;

A_{10} on hirudiinin tai sen luonnollisten varianttien sekvenssejä tai niiden osia, sidos, tai se on 1 - 11 mitä tahansa aminohappotähdettä sisältävä peptidi;

Y on karboksipään tähde, joka on OH, (C_1-C_8) alkoksi, amino, mono tai di (C_1-C_4) alkyylisubstituoitu aminohappo tai alkoholipään tähde.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_2 on I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{131}I]-Tyr tai [^{125}I]-Tyr.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_3 on Glu.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_4 on Pro.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_5 on Ile.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_6 on Pro.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_7 on Glu.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_8 on Glu.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_9 on Ala-Cha.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_{10} on D-Glu.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että X on H.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen peptidijohdannainen, t u n n e t t u siitä, että A_9 on I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr tai [^{131}I]-Tyr.

13. Menetelmä veren koaguloitumisen vähentämiseksi alustassa, t u n n e t t u siitä, että annetaan alustan olla kosketuksessa veren koaguloitumista estävän tehokkaan määrän jonkin patenttivaatimusten 1 - 12 mukaisen peptidin kanssa.

14. Kittianalyysi tai diagnostinen menetelmä trombiinin <u>in vitro</u> ilmaisemiseksi, t u n n e t t u siitä, että määritetään veressä, kudoksessa tai näytteessä ole-

vat trombiinitasot käyttämällä jotakin patenttivaatimusten 1 - 12 mukaista leimattua hirudiinipeptidiä.

15. Menetelmä minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 12 mukaisen peptidijohdannaisen tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

a) käytetään hartsia, jossa on sopivasti sitoutunut C-terminaalinen suojattu aminohappo ryhmästä A_{10};

b) kytketään sekventiaalisesti toisia alfa-aminosuojattuja aminohappoja, A_9 - A_1, jolloin saadaan haluttu suojattu aminohapposekvenssi;

c) poistetaan mainitut suojaryhmät ja puhdistetaan haluttu peptidi; ja

d) leimataan peptidi radio-halogeenilla ja puhdistetaan leimattu peptidi.