



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **315710**

(13) B1

(51) Int Cl⁷

C 12 N 15/15, C 07 K 5/00, 7/00,
A 61 K 38/55, 51/00, A 61 L 33/00

Patentstyret

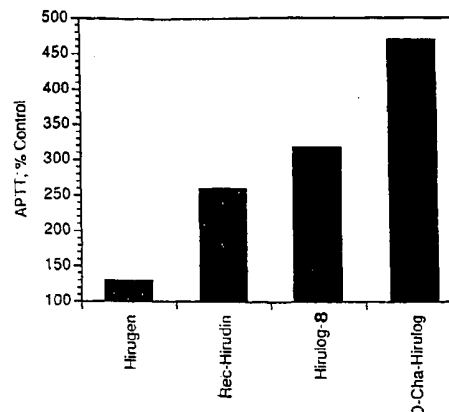
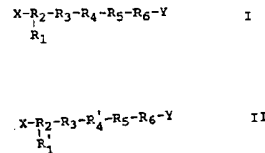
(21) Søknadsnr	19923889	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1992.02.03, PCT/US92/00836
(22) Inng. dag	1992.10.07	(85) Videreføringdag	1992.10.07
(24) Løpedag	1992.02.03	(30) Prioritet	1991.02.08, US, 652929
(41) Alm. tilgj.	1992.12.08		
(45) Meddelt dato	2003.10.13		
(71) Patenthaver	Biogen Inc, 14 Cambridge Center, Cambridge, MA 02142, US		
(72) Oppfinner	John M Maraganore, Concord, MA 01742, US Jo-Ann M Jablonski, Middleborough, MA 02345, US Paul R Bourdon, Somerville, MA 02143, US		
(74) Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, 0306 Oslo		

(54) **Benevnelse** **Forbedret inhibitorer for trombin, farmasøytisk sammensetning omfattende trombininhibitoren, anvendelse og fremgangsmåte for fremstilling av trombininhibitoren**

(56) **Anførte publikasjoner** NO 920616

(57) **Sammendrag**

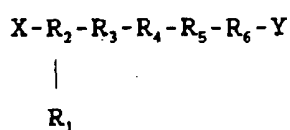
Det er beskrevet nye biologisk aktive molekyler som binder seg til og inhiberer trombinen. Disse molekyler omfatter en katalytisk seterett enhet (CSDM) av formel I, hvor X er hydrogen eller er særpreget ved en stammekjede bestående av fra 1 - 100 atomer, R₁ er valgt fra gruppen omfattende usubstituert, mono-substituerte, di-substituerte og tri-substituerte mettede ringstrukturer; R₂ er en binding eller er særpreget ved en stammekjede bestående fra i - 5 atomer; R₃ er en binding eller er særpreget ved en stammekjede bestående av fra 1 - 3 atomer; R₄ er enhver aminosyre; R₅ er enhver L-aminosyre som omfatter en guadinin eller aminoinneholdende sidekjedegruppe; R₆ er en ikke-amidbinding; og Y er særpreget ved en stammekjede bestående av fra 1 - 9 atomer eller formell II hvor R₁ er valgt fra gruppen omfattende usubstituerte, mono-substituerte, di-substituerte og tri-substituerte ringstrukturer; R₄ er enhver aminosyre omfattende en sidekjedegruppe, særpreget ved kapasiteten å akseptere en hydrogenbinding ved en pH på mellom omkring 5,5 og 9,5; og X, R₂, R₃, R₅, R₆ og Y er som definert ovenfor. Foretrukne trombininhibitorer er ytterligere særpreget ved en anionbindende eksoseteassosierende doméne (ABEAM) og en linkerdel på mellom 18Å og 42Å i lengde, som binder sammen Y til ABEAM. Det er også beskrevet blandinger, kombinasjoner og metoder som anvender disse molkekyler for terapeutiske og diagnostiske formål.



Teknisk område for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår nye biologisk aktive molekyler som binder til og inhiberer trombinen. Disse molekyler omfatter en katalytisk seterettet enhet (CSDM) av

5 formel:



10 hvor X er hydrogen eller er særpreget ved en stammekjede bestående av 1 - 100 atomer; R₁ er valgt fra gruppen omfattende usubstituerte, mono-substituerte, di-substituerte og tri-substituerte mettede homocykliske ringstrukturer; R₂ er en stammekjede bestående av fra 1 - 5 atomer; R₃ er en binding eller er en stammekjede bestående av fra 1 - 3 atomer; R₄ er enhver aminosyre; R₅ er enhver L-aminosyre som omfatter en guanidin- eller aminoinneholdende sidekjedegruppe; R₆ er en ikke-amidbinding; og Y er en binding
15 eller er særpreget ved en stammekjede bestående av fra 1 - 9 atomer.

Foretrukne trombininhibitorer er videre særpreget ved et anionbindende ekso-seteassosierende domene (ABEAM), og en linkerdel på mellom 18Å og 42Å i lengde som forbinder Y til
20 ABEAM. Foreliggende oppfinnelse angår også blandinger og kombinasjoner som inneholder disse molekyler hvor blandingene er egnet for terapeutiske, profylaktiske og diagnostiske formål.

Bakgrunnsteknikk

25 Akutte vaskulære lidelser, såsom myokardialt infarkt, slag, pulmonær emboli, trombose i dyptliggende årer, perifer arteriell okklusjon og andre tromboser i blodsystemet utgjør vesentlige helserisikoer. Slike lidelser forårsakes

av enten delvis eller total okklusjon av en blodåre av en blodpropp, som inneholder fibrin og blodplater.

Trombin er det naturlige forekommende protein som katalyserer omdannelsen av fibrinogen til fibrin, som er det
5 ende-lige trinn i blodkoaguleringsdannelse. I tillegg til å kata-lyserer dannelsen av et fibrinaggregat, aktiverer trombinen også blodplateaggregering og frigjøringsreaksjoner. Dette betyr at trombin spiller en sentral rolle både i akutt blod-plateavhengig (arteriell) trombose [S. R.
10 Hanson og L. A. Harker, "Interruption of Acute Platelet-Dependent Thrombosis by the Synthetic Antithrombin D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Arginylchloromethylketone", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, s. 3184-88 (1988)] og fibrin-avhengig (venøs) trombose.

15 Trombin har flere andre bioregulatoriske roller [J.W. Fenton, II, "Thrombin Bioregulatory Functions", Adv. Clin. Enzymol., 6, s. 186-93 (1988)]. Feks. kan trombin aktivere direkte en inflammatorisk respons ved å stimulere syntesen av blodplateaktiverende faktor (PAF) i endotelialceller [S.
20 Prescott et al., "Human Endothelial Cells in Culture Produce Platelet-Activating Factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) When Stimulated With Thrombin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, s. 3534-38 (1984)]. PAF er eksponert på overflaten av endotelialceller, og virker som
25 en ligand for neutrofil adhesjon og påfølgende degranulering [G.M. Vercolletti et al., "Platelet-Activating Factor Primes Neutrophil Responses to Agonists: Role in Promoting Neutrophil-Mediated Endothelial Damage", Blood, 71, s. 1100-07 (1988)]. Alternativt kan trombin fremme
30 inflammasjon ved å øke vaskulær permeabilitet som kan føre til ødem [P.J. Del Vecchio et al., "Endothelial Monolayer Permeability To Macromolecules", Fed. Proc., 46, s. 2511-15 (1987)]. Reagenser som blokkerer det aktive setet hos trombin, såsom hirudin, forstyrrer aktiveringen av blod-
35 plater og endotelialceller [C.L. Knupp, "Effect of Thrombin

Inhibitors on Thrombin-Induced Release and Aggregation",
Thrombosis Res., 49, s. 23-36 (1988)].

Trombin har også vært angitt i fremming av kreft basert på
egenskapen hos dets native spaltningsprodukt, fibrin, å
5 virke som et substrat for tumorvekst [A. Falanga et al.,
"Isolation and Characterization of Cancer Procoagulant: A
Cysteine Proteinase from Malignant Tissue", Biochemistry,
24, s. 5558-67 (1985); S.G. Gordon et al., "Cysteine
Proteinase Procoagulant From Amnion-Chorion", Blood, 66, s.
10 1261-65 (1985); og A. Falanga et al., "A New Procoagulant
In Acute Leukemia", Blood, 71, s. 870-75 (1988)]. Trombin
har også vært medvirkende hos neurodegenerative lidelser
basert på dets egenskap å forårsake neutritt-
tilbaketrekning [D. Gurwitz et al., "Thrombin Modulates and
15 Reverses Neuroblastoma Neurite Outgrowth", Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, 85, s. 3440-44 (1988)]. Følgelig har
muligheten for å regulere in vivo-aktiviteten hos trombins
mange viktige kliniske implikasjoner.

En rute til fremgangsrik behandling eller forebygging av
20 akutt vaskulær lidelse er inhiberingen av trombin. Mange
typer av trombininhibitorer er allerede kjent i faget.
Heparin, som er den indirekte inhibitor for trombin er i
stor utstrekning brukt for å behandle venøs trombose. Selv
om det er effektivt mot fibrinavhengig aggregatdannelse,
25 har heparin liten effektivitet til å inhibere trombinindu-
sert aktivisering av blodplater. Følgelig blir dette lege-
middel ikke brukt ved behandling av arteriell trombose.
Videre danner heparin mange uønskede bieffekter innbefat-
tende blødning og trombocytopenia.

30 Hirudin er et naturlig forekommende peptid som fremstilles
hos den blodsugende iglen *Hirudo medicinalis*. Denne for-
bindelse som syntetiseres i spyttkjertelen hos iglen, er
den kraftigste naturlige inhibitor som er kjent for koagu-
lering. Hirudin forhindrer blod fra å koagulere ved å binde
35 tett til trombin ($K_d = 2 \times 10^{-11}M$) i et 1:1 støkiometrisk

kompleks [S.R. Stone og J. Hofsteenge, "Kinetics of the Inhibition of Thrombin by Hirudin", *Biochemistry*, 25, s. 4622-28 (1986)]. Dette inhiberer i sin tur trombin fra å katalysere omdannelsen av fibrinogen til fibrin (aggregat),
5 såvel som å inhibere alle andre trombinmedierte prosesser [J.W. Fenton, II, "Regulation of Thrombin Generation and Functions", *Semin, Thromb. Hemost.*, 14, s. 234-40 (1988)].

Hirudin inhiberer trombin ved å binde til sistnevnte ved to adskilte posisjoner. Initialt samvirker C-terminalen hos
10 hirudin med et "anion-bindende eksosete" (ABE) i trombin [J.W. Fenton, II et al. "Thrombin Anion Binding Exosite Interactions with Heparin and Various Polyanions", *Ann. New York Acad. Sci.*, 556, s. 158-65 (1989)]. Etter denne lav-affinitetsbinding undergår hirudin-trombinkomplekset en
15 kon-firmasjonsmessig endring, og aminoterminaldelen av hirudin er i stand til å binde til det katalytiske sete hos trombinen [S. Kono et al., "Analysis of Secondary Structure of Hirudin and the Conformational Change Upon Interaction with Thrombin", *Arch. Biochem. Biophys.*, 267,
20 s. 158-66 (1988)].

Isoleringen, opprenskningen og aminosyresekvensen til hirudin er kjent i faget [P. Walsmann og F. Markwardt, "Biochemical and Pharmacological Aspects of the Thrombin Inhibitor Hirudin", *Pharmazie*, 36, s. 653-60 (1981); J.
25 Dodt et al., "The Complete Covalent Structure of Hirudin: Localization of the Disulfide Bonds", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 366, s. 379-85 (1985); S.J.T. Mao et al., "Rapid Purification and Revised Amino Terminal Sequence of Hirudin: A Specific Thrombin Inhibitor of the Blood-Sucking
30 Leech", *Anal. Biochem*, 161, s. 514-18 (1987); og R.P. Harvey et al., "Cloning and Expression of a cDNA Coding for the Anti-Coagulant Hirudin from the Bloodsucking Leech, *Hirudo medicinalis*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, s. 1084-88 (1986)].

I animalske studier har hirudin, som er rensset fra igler, vist effektivitet for å forhindre venøs trombose, vaskulær shunt okklusjon og trombinindusert disseminert intravaskulær koagulering. I tillegg oppviser hirudin lav toksisitet og har en meget kort klareringstid fra sirkulasjonen [F. Markwardt et al., "Pharmacological Studies on the Antithrombotic Action of Hirudin in Experimental Animals", *Thromb. Haemost.*, 47, s. 226-29 (1982)].

Hirudin har nylig blitt klonet og uttrykt i *E. coli* [EP-søknad nr. 158.564, 168.342 og 171.024] og gjær [EP-søknad nr. 200.655]. Til tross for disse fremskritt er hirudin fremdeles relativt dyrt å fremstille, og det er ikke bredt tilgjengelig kommersielt.

Nylig har det blitt gjort forsøk på å identifisere peptidfragmenter av nativt hirudin eller derivater derav, som også er effektive til å forlenge koaguleringsstider. Slike forbindelser er beskrevet i EP-søknad nr. 276.014, 291.982, 333.356, 341.607 og 372.670. Molekylene beskrevet i disse patentsøknader viste varierende effektivitet til å inhibere aggregatdannelse, men var alle 2 - 4 ganger mindre kraftige enn hirudin. Slike peptidfragmenter kan følgelig ikke være fullstendig tilfredsstillende til å oppløse blodaggregater ved pågående terapibehandlinger.

Nylig har forbindelser som etteraper virkningen til hirudin ved å binde til både det anionbindende eksosete og det katalytiske sete hos trombin blitt beskrevet (samtidig US-søknad serienr. 395.482 og 549.388). Disse forbindelser viser trombininhibitorisk aktivitet som er lik eller større enn nativt hirudin. De er også mindre enn hirudin og følgelig mindre antigeniske. Disse inhibitorer blir også fremstilt syntetisk, noe som tillater fremstilling av kommersielt mulige mengder ved rimelig omkostninger.

Til tross for utviklingen frem til idag er det et stadig behov for enda kraftigere trombininhibitorer, som kan frem-

stilles billig og i kommersielt gunstige mengder. Slike inhibitorer ville ikke bare være effektive ved behandling og forebygging av vaskulær lidelse, men kan også være terapeutisk anvendelige ved behandling av kreft,
 5 neurodegenerative lidelser og inflammasjon.

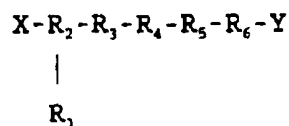
Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse fremskaffer molekyler som er kraftige inhibitorer for trombin. Disse molekyler har blitt utarbeidet basert på den tre-dimensjonale røntgenstråle-
 10 krystallografiske struktur av et trombin-inhibitor-kompleks. Pga. dette er inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse rommessig fordelt for å gi den beste tilpasning i de tre-dimensjonale rom, i og omkring det katalytiske setet til trombin. Dette resulterer i molekyler som har optimal trombininhibitorisk aktivitet.
 15

Oppfinnelsen fremskaffer videre trombininhibitorer som i tillegg omfatter en enhet som binder til det anionbindende eksosete hos trombinen. Disse inhibitorer etteraper kvalitativt virkningen til hirudin. Fordi disse molekyler er
 20 utarbeidet for optimal rommessig konfigurasjon, er de kraftigere enn hirudin. Den høye virkning til inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, tillater dem å bli tilført til pasienter i doseringer som er forholdsmessig lavere enn de som er nødvendig i hirudinbaserte terapibehandlinger.

25 Videre fremskaffer oppfinnelsen en trombininhibitor omfattende:

a) en katalytisk sete-rettet enhet som utgjøres av formelen:



- hvor X er hydrogen eller er særpreget ved å være en stammekjede som omfatter fra 1 til 100 atomer; R_1 er valgt fra gruppen omfattende usubstituerte, monosubstituerte, disubstituerte og trisubstituerte mettede homocykliske ringstrukturer med 6 atomer;
- 5 R_2 er en stammekjede som består av fra 1 til 5 atomer;
- R_3 er en binding eller er en stammekjede som består av fra 1 til 3 atomer;
- R_4 er enhver aminosyre;
- 10 R_5 er enhver L-aminosyre som omfatter en guanidin- eller aminoinnholdende sidekjedegruppe;
- R_6 er en ikke-amidbinding; og
- Y er en stamme som består av fra 1 til 9 atomer; og
- b) en linker-enhet som har en stammekjede med en utregnet
- 15 lengde på mellom 18 Å og omkring 42 Å; og
- c) en anionbindende eksosete-assosierende enhet, hvor nevnte katalytiske seterettede enhet er bundet til nevnte anionbindende eksosete-assosierende enhet via i b) nevnte linker-enhet, og hvor nevnte inhibitor er i stand til
- 20 samtidig å binde til det katalytiske sete og det anionbindende eksosete hos trombin; som er særpreget ved at nevnte inhibitor har en øket lipofil interaksjon med trombin i forhold til interaksjonen mellom trombin og (D-Phe)-Pro-Arg-Pro-(Gly)₄-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-
- 25 Glu-Glu-Tyr-Leu og hvor nevnte økede lipofile interaksjon er grunnet R_1 .

Molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli brukt i blandinger og metoder for å inhibere enhver trombinmediert eller trombinassosiert funksjon eller prosess. Farmasøytiske blandinger innholdende disse molekyler, såvel som

30 metoder for behandling eller profilakse av vaskulære lidelser, inflammatoriske responser, karsinomer og neurodegenerative lidelser ved å bruke disse inhibitorer, er også deler av foreliggende oppfinnelse. Disse molekyler kan

35 også bli anvendt i blandinger og metoder for ex vivo

bildegjengivelse for lagring og behandling av utenom-
legemlig blod, og for belegging av invasive anordninger. I
tillegg kan molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse bli
tilført til en pasient i kombinasjon med et fibrinolytisk
5 middel for å øke effektiviteten av en gitt dose av dette
middel, og å senke doseringen av dette middel som er nød-
vendig for en gitt effekt, såsom oppløsning av en blod-
propp.

Pga. det at molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse kan
10 bli fremstilt ved kjemiske synteseteknikker, kan kommer-
sielt passende mengder bli fremstilt på billig måte. Videre
fordi molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse er
vesentlig mindre enn trombininhibitorene, som for tiden
blir anvendt i medisinsk behandling, er de mindre sann-
15 synlig til å stimu-lere en uønsket immunrespons hos
pasienter behandlet med dem. Følgelig er bruken av disse
trombininhibitorer ikke begrenset til behandling av akutte
lidelser. Disse molekyler kan også bli anvendt i terapi for
kroniske tromboemboliske lidelser, såsom atherosclerose og
20 restenose etter angioplasti. Molekylene ifølge foreliggende
oppfinnelse kan også bli anvendt på en mengde andre områder
i stedet for kjente trombininhibitorer, spesielt heparin
eller hirudin.

Slik det vil bli forstått fra beskrivelsen, som følger, er
25 molekylene, blandingene og fremgangsmåtene ifølge forelig-
gende oppfinnelse anvendelige ved fremstilling av medika-
menter egnet til behandling og forebygging av forskjellige
lidelser som skyldes de uønskede effekter hos trombin,
såvel som for diagnostiske formål.

30 Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 viser en romfyllende modell av Hirulog-8-trombin
komplekset.

Figur 2 er en skjematisk angivelse av interaksjonen mellom D-Phe av Hirulog-8 og den hydrofobiske lomme som ligger ved siden av det katalytiske sete hos trombin.

Figur 3 er en skjematisk angivelse av interaksjonen mellom prolin i 2-posisjon hos Hirulog-8 og trombin.

Figur 4 viser den sammenlignede antikoaguleringsaktivitet til hirudin, rekombinant hirudin, Hirulog-8 og D-Cha-hirulog.

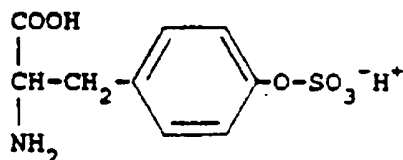
Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

De følgende vanlig forkortelser av aminosyrene er brukt gjennom beskrivelsen og i kravene:

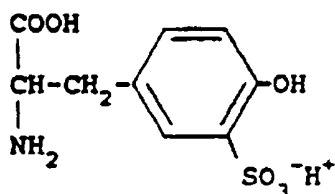
Orn - ornitin	Gly - glysin
Ala - alanin	Val - valin
Leu - leucin	Ile - isoleucin
15 Pro - prolin	Phe - fenylalanin
Trp - tryptofan	Met - metionin
Ser - serin	Thr - treonin
Cys - cystein	Tyr - tyrosin
Asn - aspargin	Gln - glutamin
20 Asp - asparginsyre	Glu - glutaminsyre
Lys - lysin	Arg - arginin
His - histidin	Nle - norleucin
Npa - naptylalanin	Cha - cykloheksylalanin
Hyp - hydroksyprolin	Tpro- tioprolin
25 Ac - acetyl	Suc - succinyl
BOC - <u>tert</u> Butoksykarbonyl	Tos - <u>para</u> Toluensulfonyl
Cbz - karbobenzyløksy	Inp - isonipekonsyre
3,4,dehydroPro - 3,4,- dehydroprolin	Sar - sarkosin (N-metylglysin)
30 Tyr(OSO ₃ H) - tyrosin-O-sulfat	Tyr(SO ₃ H) - 3-sulfo-tyrosin
3-,5-dijodTyr - 3-,5-dijodtyrosin	

Uttrykket "enhver aminosyre" som brukt heri innbefatter L-isomerene av de naturlig forekommende aminosyrer, såvel som andre "ikke-protein" α -aminosyrer, som vanligvis brukes av personer innen peptidkjemifaget ved fremstilling av syntetiske analoger av naturlig forekommende aminopeptider. De naturlig forekommende aminosyrer er glysin, alanin, valin, leucin, isoleucin, serin, metionin, treonin, fenylalanin, tyrosin, tryptofan, cystein, prolin, histidin, asparaginsyre, asparagin, glutaminsyre, glutamin, γ -karboksylglutaminsyre, arginin, ornitin og lysin. Eksempler på "ikke-protein" α -aminosyrer innbefatter norleucin, norvalin, alloisoleucin, homoarginin, tioprolin, dehydroprolin, hydroksyprolin (Hyp), isonipekonsyre (Inp), homoserin, cykloheksylglycin (Chg), α -amino-n-smørsyre (Aba), cykloheksylalanin (Cha), aminofenyl-smørsyre (Pba), fenylalaniner substituert ved orto-, meta- eller paraposisjonen av fenyleneheten med én eller to av de følgende: en (C_1 - C_4) alkyl, en (C_1 - C_4) alkoksy, halogen- eller nitrogrupper eller substituert med en metyldioksygruppe; β -2- og 3-tienylal-alanin, β -2- og 3-furanylalanin, β -2-, 3- og 4-pyridylalanin, β -(benzotienyl-2- og 3-yl) alanin, β -(1- og 2-naftyl)alanin, O-alkylerte derivater av serin, treonin eller tyrosin, S-alkylert cystein, S-alkylert homocystein, O-sulfat, O-fosfat og O-karboksylatestere av tyrosin, 3- og 5-sulfotyrosin, 3- og 5-karboksy-tyrosin, 3- og 5 fosfotyrosin, 4-metan sulfonsyre-ester av tyrosin, 4-metan fosfonsyreestere av tyrosin, 4-fenyleddiksyre, 3,5-dijodtyrosin, 3- og 5-nitrotyrosin, ϵ -alkyllysin, delta-alkyl ornitin og D-isomerende av enhver av de ovennevnte aminosyrer. Med mindre spesielt angitt, er alle aminosyrer referert til i foreliggende søknad i L-formen.

Forbindelsene referert til heri som tyrosin-O-sulfat, Tyr(OSO_3H) og O-sulfatester av tyrosin, er identiske og har strukturformelen;



Forbindelsene referert til heri som Tyr(SO₃H), 3-sulfo-tyrosin og 5-sulfo-tyrosin er identiske, og har den strukturelle formel;



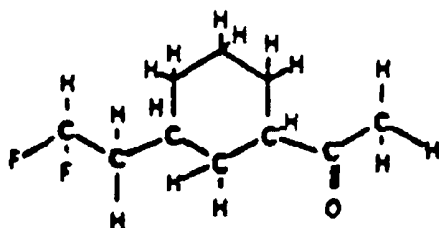
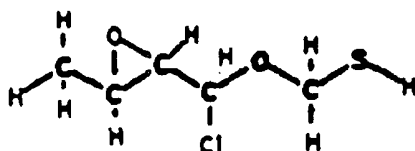
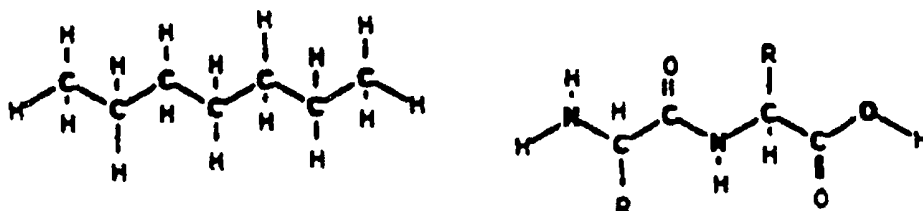
Uttrykket "pasient" som brukt i foreliggende søknad refererer til ethvert pattedyr, spesielt mennesker.

Uttrykket "anionisk aminosyre" som brukt heri betyr et meta, para eller orto, mono- eller di-substituert fenylalanin, cykloheksylalanin eller tyrosin inneholdende en negativt ladet enhet, såvel som S-alkylert cystein, S-alkylert homo-cystein, γ-karboksyglutaminsyre, ε-alkyl-
 10 lysin, delta-alkylornitin, glutaminsyre og asparaginsyre. Eksempler på anioniske aminosyrer er O-sulfat, O-fosfat og O-karboksyloxyester av tyrosin, 3- og 5-sulfo-tyrosin, 3- og 5-karbo-tyrosin, 3- og 5-fosfo-tyrosin, 4-metansulfon-
 15 syreester av tyrosin, 4-metanfosfonsyreester av tyrosin, 4-fenyleddiksyre, 3,5-dijodtyrosin og 3- og 5-nitrotyrosin.

Uttrykkene "katalytisk sete", "aktivt sete" og "aktive sidelomme" som brukt heri, refererer til ethvert eller alle av de følgende seter hos trombin: det substratbindende
 20 eller "S₁" sete; det hydrofobisk bindende eller "oljeaktige" sete; og setet hvor spaltning av et substrat faktisk blir utført ("ladningsoverførende sete").

Uttrykket "stammekjede" som brukt heri, refererer til den del av en kjemisk struktur som definerer det minste antall påfølgende bindinger som kan bli fulgt fra en ende av den kjemiske struktur til den andre. Atomkomponentene som utgjør stammekjeden kan omfatte ethvert atom som er i stand til å danne bindinger med minst to andre atomer.

F.eks. er hver av de følgende kjemiske strukturer særpreget ved en stammekjede på syv atomer (atomene som utgjør stammekjeden er indikert med uthevet skrift):

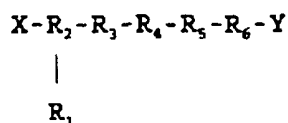


10 Uttrykket "utregnet lengde" som brukt i foreliggende søknad, refererer til en forutsatt måling utledet ved å summere opp bindingslengdene mellom atomene som utgjør stammekjeden. Bindingslengder mellom to gitte atomer er velkjent i faget [se feks. CRC Handbook of Chemistry and Physics,

65th Edition, R.C. Weist, ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, s. F-166-70 (1984)].

Søkerne har analysert strukturen til et trombin-hirulog-8 kompleks ved tre-dimensjonal røntgenstrålekystallografi. Hirulog-8 er en inhibitor som binder til både det anioniske bindingseksose og det katalytiske sete hos trombin. Den har formelen: (D-Phe)-Pro-Arg-Pro-(Gly)-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu. Syntesen av denne forbindelse er beskrevet i samtidig US-søknad serienr. 395,482 og i eksempel 1 i foreliggende søknad. Disse kystallografiske data viser flere strukturelle trekk i og omkring det aktive sete av trombin som var uvurderlige ved utforming av de forbedrede trombininhibitorer ifølge foreliggende oppfinnelse.

Et av disse strukturelle trekk er en hydrofobisk lomme i trombin ved siden av dets katalytiske sentrum. I Hirulog-8 opptar det N-terminale D-Phe residuum, spesielt fenylingen hos denne aminosyre, i dette rom. Det å substituere en umettet ring for den mettede ring øker de lipofile interaksjoner med trombin, og øker således inhibitorisk styrke. Følgelig, ifølge en utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, har trombininhibitoren formel:



hvor X er hydrogen eller er særpreget ved en stammekjede bestående av fra 1 - 100 atomer; R_1 er valgt fra gruppen omfattende usubstituerte, mono-substituerte, di-substituerte og tri-substituerte mettede homocykliske ringstrukturer; R_2 er en stammekjede bestående av fra 1 - 5 atomer; R_3 er en binding eller er en stammekjede bestående av fra 1 - 3 atomer; R_4 er enhver aminosyre; R_5 er enhver L-aminosyre som omfatter en guanidin- eller aminoinneholdende sidekjedegruppe; R_6 er en ikke-amidbinding; og Y er en

stammekjede bestående av fra 1 - 9 atomer. Eksempler på L-aminosyrer som utgjør en guanidin- eller aminoinneholdende sidekjede er arginin, lysin og ornitin.

Fortrinnsvis er den mettede homosykliske eller heterosykliske ringstruktur supplert av et D-cykloheksyl-alanin (D-Cha), et mono-substituert D-Cha, et di-substituert D-Cha eller et tri-substituert D-Cha residuum (dvs. X er H₂N; R₁ er valgt fra gruppen bestående av usubstituert, mono-substituert, di-substituert og tri-substituert heksan; R₂ er CH₂-CH; og R₃ er C=O). Mest foretrukket, X er H₂N; R₁ er heksan; R₂ er CH₂-CH; R₃ er C=O; R₄ er prolin; R₅ er arginin og Y er prolin.

Tilstedeværelsen av en ikke-amidbinding ved R₆ forsinker eller forhindrer spaltning av inhibitoren av trombin. Ikke-amidbindingskomponenten kan bli dannet ved kjemisk å modifisere en amidbinding. Dette kan bli oppnådd ved metoder vel-kjent i faget [M. Szelke et al., "Potent New Inhibitors of Human Renin", *Nature*, 299, s. 555-57 (1982)]; D.H. Coy et al., "Facile Solid Phase Preparation of Proteins containing the CH₂-NH Peptide Bond Isostere and Application to the Synthesis of Somatostatin (SRIF) Octapeptide Analogues", *Peptides* 1986, D. Theodoropoulos, Ed., Walter Gruyter & Co., Berlin, s. 143-46 (1987)]. Når en ikke-amidbinding blir dannet på denne måte, er det foretrukket at den kjemiske modifikasjon blir utført før addisjonen av den delen av molekylet som inneholder denne binding til resten av trombininhibitoren. På denne måte kan delen som inneholder denne ikke-amidbinding bli tilsatt på én gang i et enkelt syntesetrinn til resten av inhibitoren.

I den mest foretrukne utførelsesform er R₅ Arg og Y er Pro. I denne utførelsesform er R₆ en naturlig forekommende imidbinding som sakte spaltes av trombin. Dette unngår nødvendigheten av å danne på forhånd ikke-amidbindingen og tillater Y og R₆ å bli tilført til resten av inhibitoren sekvensielt i stedet for på en gang.

Ytterligere analyse av den Hirulog-8-trombin krystallografiske struktur, viste at prolinet bundet til D-Phe av Hirulog-8 lå innen 3,46 Å av hydroksylgruppen hos Tyr76 av trombin. Fordi denne avstanden var nær nok for å danne hydrogenbindinger, bør substitusjonen av en aminosyre omfattende en sidekjedegruppe som er særpreget ved kapasiteten å akseptere en hydrogenbinding ved en pH på mellom 5,5 og 9,5 for Pro ved denne posisjonen øker bindingsaffiniteten til inhibitoren.

10 Aminosyrer omfattende en sidekjedegruppe særpreget ved kapasiteten å akseptere en hydrogenbinding ved en pH på mellom omkring 5,5 og 9,5 er velkjent i faget. Feks. er histidin (som inneholder et imidazolnitrogen), tioprolin (som inneholder en tiolgruppe), og isonipecotinsyre (som 15 inneholder en karboksylat sidegruppe) og er kjent for å være hydrogenbindingsakseptorer ved pH 5,5 til 9,5.

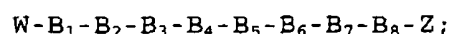
Mer foretrukne trombininhibitorer i henhold til foreliggende oppfinnelse, omfatter et usubstituert, mono-substituert, di-substituert og tri-substituert heksan ved R_1 posisjonen. Mest foretrukket er $X H_2N$, R_1 er heksan, R_2 er CH_2-CH og R_3 er $C=O$ og den resulterende aminosyre dannet av X , R_1 , R_2 og R_3 er i D-konfigurasjonen (dvs. D-Cha). Mest foretrukket er R_4 enhver aminosyre som omfatter en sidekjede som har kapasiteten å akseptere et hydrogen ved 25 en pH på mellom 5,5 og 9,5.

Trombininhibitoren ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter ytterligere en anionbindende eksosete-assosierende enhet (ABEAM), og en linker bundet til Y ved en ende og ABEAM ved den andre. Lignende trombininhibitorer er blitt beskrevet i 30 samtidige US-søknader nr. 549.388 innlevert 6. juli 1990 og 395.482 innlevert 18. august 1989, hvorav begge er heri innbefattet pr. referanse, men foreliggende foretrukne inhibitorer er overraskende og uventet kraftigere.

Linkerområdet av inhibitoren utgjør en bro mellom CSDM og ABEAM. Følgelig er det lengden av linkerens, i stedet for dets struktur, som er viktigst. Den utregnede lengde av stammekjeden som særpreger linkerens, må være minst 18 Å -
 5 avstanden mellom det katalytiske sete og det anionbindende eksosete hos trombin - og mindre enn omkring 42 Å.

Stammekjeden til linkerens kan omfatte alle atomer som er i stand til å binde til minst to andre atomer. Fortrinnsvis består stammekjeden av enhver kjemisk tenkbar kombinasjon
 10 av atomer, valgt fra oksygen, karbon, nitrogen og svovel. Fagmannen vil være klar over hvilken kombinasjon av ovennevnte stammekjedeatomer som faller innenfor den nødvendige lengde, basert på kjente avstander mellom forskjellige bindinger [se feks. R.T. Morrison og R.N. Boyd, Organic
 15 Chemistry, 3rd Edition, Allyn and Bacon, Inc., Boston, Massachusetts (1977)]. I henhold til en foretrukket utførelsesform, er linkerens et peptid som består av aminosyresekvensen Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe. Foretrukket er aminosyren bundet til ABEAM komponenten Phe.

20 Foretrukne trombininhibitorer er hvor det ABEAM som binder til de anionbindende eksosete hos trombin har formelen:



hvor W er en binding; B₁ er en anionisk aminosyre; B₂ er enhver aminosyre; B₃ er Ile, Val, Leu, Nle eller Phe; B₄ er
 25 Pro, Hyp, 3,4-dehydroPro, tiazolidin-4-karboksyilat, Sar, enhver N-metyl aminosyre eller D-Ala; B₅ er en anionisk aminosyre; B₆ er en anionisk aminosyre; B₇ er en lipofil aminosyre valgt fra gruppen omfattende Tyr, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha, Pro, eller et dipeptid bestående av en
 30 av disse lipofile aminosyrer og enhver annen aminosyre; B₈ er en binding eller en peptidinnholdende form av en til fem residuer av enhver aminosyre; og Z er OH eller har en stammekjede bestående av mellom 1 og 6 atomer.

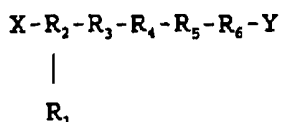
Peptider som er homologe med karboksyterminaldelen av hirudin, har blitt vist å binde til det anionbindende hos trombin [parallell US-søknad nr. 314.756 og J.M. Maraganore et al., "Anticoagulant Activity of Synthetic Hirudin Peptides", J. Biol. Chem., 265, s. 8692-98 (1989); hvor begge
5 som omfattes heri ved referanse].

I henhold til en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, er ABEAM homolog med aminosyrene 56-64 av hirudin, dvs. B₁ er Glu, B₂ er Glu; B₃ er Ile; B₄ er Pro; B₅
10 er Glu; B₆ er Glu; B₇ er Tyr-Leu, Tyr(SO₃H)-Leu eller Tyr(OSO₃H)-Leu, eller (3-,5-dijodTyr)-Leu; B₈ er en binding; og Z er OH. De bør bemerkes at nativt hirudin inneholder Tyr(OSO₃H) ved posisjon 63. Imidlertid har karboksyterminale hirudinpeptider, som inneholder Tyr(SO₃H)
15 identisk antikoagulerende aktivitet med de som inneholder det native Tyr(OS₃H) [se samtidig US-søknad nr. 314.756].

Andre ABEAM-komponenter innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse, kan omfatte de deler av ethvert molekyl som er kjent for å binde til det anionbindende sete hos trombin.
20 Disse innbefatter aminosyrene 1675-1686 av Faktor V, aminosyrene 272-285 av blodplate-glykoprotein Ib, aminosyrene 415-428 av trombomodulin, aminosyrene 245-259 av protrombin Fragment 2 og aminosyrene 30-44 av fibrinogen A α -kjede. I tillegg kan ABEAM komponenten bli valgt fra enhver av hirudinpeptidanalogene beskrevet av J.L. Krstenansky et al.,
25 "Development of MDL-28.050, A Small Stable Antithrombin Agent Based On A Functional Domain of the Leech Protein, Hirudin", Thromb. Haemostas., 63, s. 208-14 (1990), spesielt de som utgjør sekvensen Asp-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-(D-Glu).
30

En foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen angår en trombininhibitor omfattende:

a) en katalytisk sete-rettet enhet som utgjøres av formelen:



- hvor X er hydrogen eller er særpreget ved å være en stammekjede som omfatter fra 1 til 100 atomer; R₁ er valgt fra gruppen omfattende usubstituerte, monosubstituerte, disubstituerte og trisubstituerte mettede homocykliske ringstrukturer med 6 atomer;
- R₂ er en stammekjede som består av fra 1 til 5 atomer;
- R₃ er en binding eller er en stammekjede som består av fra 1 til 3 atomer;
- R₄ er enhver aminosyre;
- R₅ er enhver L-aminosyre som omfatter en guanidin- eller aminoinnholdende sidekjedegruppe;
- R₆ er en ikke-amidbinding; og
- Y er en stamme som består av fra 1 til 9 atomer; og

b) en linker-enhet som har en stammekjede med en utregnet lengde på mellom 18 Å og omkring 42 Å; og

c) en anionbindende eksosete-assosierende enhet, hvor nevnte katalytiske seterettede enhet er bundet til nevnte anionbindende eksosete-assosierende enhet via i b) nevnte linker-enhet, og hvor nevnte inhibitor er i stand til samtidig å binde til det katalytiske sete og det anionbindende eksosete hos trombin; som er særpreget ved at nevnte inhibitor har en øket lipofil interaksjon med trombin i forhold til interaksjonen mellom trombin og (D-Phe)-Pro-Arg-Pro-(Gly)₄-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu og hvor nevnte økede lipofile interaksjon er grunnet R₁.

Trombininhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan syntetiseres med forskjellige teknikker som er velkjent i faget. Disse innbefatter organiske kjemiske synteseteknikker, fastfase peptidsyntese, oppløsningsfase peptidsyntese eller en kombinasjon av disse teknikker. Deler av enkelte inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan også bli

fremstilt ved andre metoder, såsom enzymatisk spaltning av naturlig eller rekombinant hirudin eller rekombinante DNA teknikker. Disse deler kan så bli bundet til de syntetisk fremstilte deler av inhibitoren for å danne det endelige produkt i henhold til foreliggende oppfinnelse. Valget av synteseteknikk vil selvfølgelig avhenge av sammensetningen av den spesielle inhibitor.

I en foretrukket utførelsesform av foreliggende oppfinnelse blir trombininhibitoren syntetisert via en blandet heterolog/fastfase teknikk. Denne teknikk innbefatter fastfase-syntesen av alt eller det meste av peptiddelen av molekylet, fulgt av tilsetningen av ikke-aminosyrekomponentene som syntetiseres med oppløsningsfaseteknikker. Ikke-aminosyren kan bli koblet til peptiddelen via fastfase eller oppløsningsfasemetoder. På lignende måte kan alle gjenværende peptideler også bli lagt til via fastfase eller oppløsningsfasemetoder. Dette utgjør de mest kostnadseffektive fremgangsmåter for fremstilling av kommersielle mengder av disse molekyler.

Når "ikke-protein"-aminosyrer er inneholdt i trombininhibitoren ifølge foreliggende oppfinnelse, kan de enten bli tilsatt direkte til den voksende kjede under peptidsyntese eller fremstilt ved kjemisk modifikasjon av det fullstendige syntetiserte peptid, avhengig av naturen til den ønskede "ikke-protein"-aminosyre. Fagmannen innenfor teknikken kjemisk syntese er fullstendig klar over hvilke "ikke-protein"-aminosyrer som kan bli tilsatt direkte, og hvilke som må bli syntetisert ved kjemisk å modifisere den fullstendige peptidkjede etter peptidsyntese.

Molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse oppviser kraftig anti-koagulerende aktivitet. Denne aktivitet kan bli undersøkt in vitro ved å bruke enhver konvensjonell teknikk. Foretrukket innbefatter et assay for anti-koagulerende aktivitet direkte bestemmelse av den trombininhibitoriske aktivitet for molekylet. Slike teknikker måler inhiberingen

av trombinkatalysert spaltning av kolorimetriske substrater, eller mer foretrukket, økningen i trombintider eller økning i aktiverte partielle tromboplastintider av humant plasma. Sistnevnte assay måler faktorer i den "mellomliggende" koaguleringsvei. Alternativt kan det anvendte assay bruke rensed trombin og fibrinogen for å måle inhiberingen av fri-gjøring av fibrinopeptider A eller B ved radioimmunoassay eller ELISA.

Anti-blodplateaktiviteten til molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli målt med et antall konvensjonelle blodplateassays. Foretrukket vil assayet måle endringen i aggregeringsgraden av blodplater eller en endring i frigjøringen av en blodplatesekretorisk komponent i nærvær av trombin. Førstnevnte kan bli målt i et aggregometer. Sistnevnte kan bli målt ved å bruke RIA- eller ELISA-teknikker som er spesifikke for den utskilte komponent.

Molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse er anvendelige i blandinger, kombinasjoner og fremgangsmåter ved fremstilling av medikamenter som er egnet for behandling og profylakse av forskjellige lidelser som skyldes trombinmedierte og trombinassosierte funksjoner og prosesser. Disse innbefatter myokardialt infarkt, slag, pulmonær emboli, dype venetromboser, perifer arteriell okklusjon, restenose etter arteriell skade eller invasive kardiologiske inngrep, akutt eller kronisk aterosklerose, ødem og inflammasjon, forskjellige celleregulatoriske prosesser (feks. sekresjon, formendring, proliferasjon), kreft og metastase, og neurodegenerative lidelser.

Trombininhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan bli utformet ved å bruke konvensjonelle metoder for å fremstille farmasøytisk anvendelige blandinger, såsom tilsetning av farmasøytisk akseptable bæremidler. Disse blandinger og metoder som anvender dem, kan bli brukt for å behandle eller forhindre trombotiske lidelser i en pasient.

I henhold til en alternativ utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, kan trombininhibitorene bli anvendt i kombinasjoner, sammensetninger og fremgangsmåter ved fremstilling av medikamenter som er egnet for behandling av trombotisk lidelse, og for å minke doseringen av et trombolytisk middel som er nødvendig for å etablere reperfusjon eller forhindre reokklusjon i en pasient. I tillegg kan trombininhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, bli brukt i kombinasjoner, blandinger og fremgangsmåter ved fremstilling av medikamenter som er egnet for å minke reperfusjonstid eller øke reokklusjonstid hos en pasient behandlet med et trombolytisk middel. Disse kombinasjoner og blandinger omfatter en farmasøytisk effektiv mengde av en trombininhibitor ifølge foreliggende oppfinnelse, og en farmasøytisk effektiv mengde av et trombolytisk middel.

I disse kombinasjoner og sammensetninger arbeider trombininhibitoren og det trombolytiske middel på en komplementær måte for å oppløse blodpropper, noe som resulterer i minket reperfusjonstid og øket reokklusjonstid hos pasienter behandlet med dem. Spesielt oppløser det trombolytiske middel proppen, mens trombininhibitoren forhindrer nylig eksponert, proppinnfaget eller proppbundet trombin fra å regenerere proppen. Bruken av trombininhibitoren i kombinasjonene og blandinger ifølge foreliggende oppfinnelse, til-later fordelaktig tilføringen av trombolytisk middel i doser som tidligere var ansett for å være for lave til å resultere i trombolytiske effekter om de ble gitt alene. Dette unngår noen av de uønskede bieffekter, assosiert med bruken av trombolytiske midler, såsom blødningskomplikasjoner.

Trombolytiske midler som kan bli brukt i kombinasjonene og blandinger ifølge foreliggende oppfinnelse, er de som er kjent i faget. Slike midler innbefatter, men er ikke begrenset til vevsplasminogenaktivator rensset fra naturlige kilder, rekombinant vevsplasminogenaktivator, streptokinase, urokinase, prourokinase, anisolert streptokinase-

plasminogenaktivator-kompleks (ASPAC), animalske spyttkjertelplasminogenaktivatorer og kjente biologisk aktive derivater av enhver av de ovennevnte.

Uttrykket "kombinasjon" som brukt heri, innbefatter en enkel doseringsform inneholdende minst én trombininhibitor ifølge foreliggende oppfinnelse og minst et trombolytisk middel; en multippel doseringsform hvor trombininhibitor og det trombolytiske middel blir tilført separat, men samtidig; eller en multippel doseringsform hvor de to komponenter blir tilført separat, men sekvensielt. I sekvensiell tilførsel, kan trombininhibitoren bli gitt til pasienten under tidsperioden som strekker seg fra omkring 5 timer før til omkring 5 timer etter tilførsel av det trombolytiske middel. Foretrukket blir trombininhibitoren tilført til pasienten i løpet av perioden, som strekker seg fra 2 timer før til 2 timer etter tilførsel av det trombolytiske middel.

Alternativt kan trombininhibitor og det trombolytiske middel være i form av et enkelt konjugert molekyl. Konjugering av de to komponenter kan bli oppnådd ved standard kryssbindingsteknikker velkjent i faget. Det enkelte molekyl kan også ta form av et rekombinant fusjonsprotein, dersom både trombininhibitoren og det trombolytiske middel er peptidiske.

Forskjellige doseringsformer kan bli anvendt for å tilføre blandingene og kombinasjonene ifølge foreliggende oppfinnelse. Disse innbefatter, men er ikke begrenset til parenteral tilførsel, oral tilførsel og topisk tilførsel. Blandingene og kombinasjonene av foreliggende oppfinnelse kan tilføres til pasienten i enhver farmasøytisk akseptabel doseringsform, innbefattende de som kan tilføres til en pasient intravenøst som bolus eller kontinuerlig infusjon, intra-muskulært - innbefattende paravertebralt og periartikulært - subkutant, intrakutant, intra-artikulært, intrasynovialt, intratekalt, intra-lesjonalt, periostalt

eller ved orale-, nasale- eller topsiske ruter. Slike blandinger og kombinasjoner blir foretrukket tilpasset for topisk-, natal-, oral- og parenteral tilførsel, men mest foretrukket, formulert for parenteral tilførsel.

- 5 Parenterale blandinger blir mest foretrukket tilført intravenøst, enten i en bolusform eller som en konstant infusjon. Dersom trombininhibitoren blir brukt som en anti-blodplateforbindelse, er konstant infusjon foretrukket. Dersom trombininhibitoren blir brukt som et anti-koaguleringsmiddel, er en subkutan eller intravenøs bolusinjeksjon foretrukket. For parenteral tilførsel er væskeenhetsdoserformer foretrukket som inneholder en trombininhibitor ifølge foreliggende oppfinnelse, samt et sterilt bæremiddel. Trombininhibitoren kan enten være
- 10 suspendert eller oppløst, avhengig av naturen til bæremidlet og naturen til den spesielle trombininhibitor. Parenterale blandinger blir normalt fremstilt ved å oppløse trombininhibitoren i et bæremiddel, eventuelt sammen med andre komponenter, og filtersterilisering før fylling i et
- 15 passende glass eller ampulle og forsegling. Foretrukket blir adjuvanter, såsom lokale bedøvningsmidler, preservativer og bufringsmidler, også oppløst i bæremidlet. Blandingen kan så bli frosset og frysetørket for å øke stabilitet.
- 20
- 25 Parenterale suspensjoner fremstilles i hovedsak på samme måte, bortsett fra at den aktive komponent suspenderes i stedet for oppløses i bæremidlet. Sterilisering av blandingen blir fortrinnsvis oppnådd ved eksponering til etylenoksyd før suspensjon i det sterile bæremiddel. Fordelaktig
- 30 blir et overflateaktivt middel eller fuktende middel innbefattet i blandingen, for å lette uniform fordeling av dens komponenter.

- Tabletter og kapsler for oral tilførsel kan inneholde vanlige eksipienter, såsom bindingsmidler, fyllmidler, fortynningsmidler, tableteringsmidler, smøremidler, disintegran-
- 35

ter og fuktemidler. Tabletten kan bli belagt i henhold til metoder som er velkjent i faget. Passende fyllmidler som kan bli anvendt, innbefatter cellulose, mannitol, laktose og andre lignende midler. Egnede disintegranter innbefatter, men er ikke begrenset til stivelse, polyvinylpyrrolidon og stivelsesderivater, såsom natrium-stivelseglykolat. Egnede smøremidler innbefatter feks. magnesiumstearat. Egnede fuktemidler innbefatter natriumlaurylsulfat.

Orale flytende preparater kan være i form av vandige eller oljeaktige suspensjoner, oppløsninger, emulsjoner, sirupper eller elixerer, eller kan bli fremskaffet som et tørt produkt for rekonstituering med vann eller annet egnet middel før bruk. Like flytende preparater kan inneholde konvensjonelle additiver. Disse innbefatter suspensjonsmidler; såsom sorbitol, sirup, metylcellulose, gelatin, hydroksyetylcellulose, karboksymetylcellulose, aluminiumstearatgel eller hydrogenerte spiselige fettstoffer; emulgeringsmidler som inneholder lekitin, sorbitanmonooleat, polyetynglykoler eller akacia; ikke-vandige midler, såsom valnøttolje, fraksjonert kokkosnøttolje og oljeestere; og preservative, såsom metyl- eller propyl-p-hydroksybenzoat eller sorbinsyre.

Blandinger utformet for topisk tilførsel kan feks. være i vandig gelé, oljesuspensjon eller emulgert kremform.

Doseringen og doseringsgraden av trombininhibitoren vil avhenge av et antall faktorer, såsom størrelsen til pasienten, den spesielle farmasøytiske blanding som er brukt, målet for behandlingen, dvs. terapi eller profylakse, naturen til den trombotisk lidelse som skal behandles og vurderingen til den behandlende lege.

En foretrukket farmasøytisk effektiv daglig dose av trombininhibitor ifølge foreliggende oppfinnelse ligger mellom omkring 0,5 nmol/kg kroppsvekt av pasient som skal

behandles ("kroppsvekt") og omkring 2,5 $\mu\text{mol/kg}$ kroppsvekt.

I sammensetninger inneholdende et trombolytisk middel, ligger en farmasøytisk effektiv daglig dose av det trombolytiske middel mellom omkring 10% og 80% av den konvensjonelle doseringsområde. Det "konvensjonelle doserings-

5 område" av et trombolytisk middel er den daglige dose som blir brukt når dette middel blir anvendt i mono-terapi. [Physician's Desk Reference 1989, 43rd Edition, Edward R. Barnhart, publisher.] Dette konvensjonelle doseringsområde

10 vil selvfølgelig variere, avhengig av det anvendte trombolytiske middel. Eksempler på vanlige doseringsområder er som følger: urokinase - 500,000 - 6,250,000 enheter/-

pasienter; streptokinase - 140,000 - 2,500,000 enheter/-

15 pasienter; tPA - 0,5 - 5,0 mg/kg kroppsvekt; ASPAC -0,1 -

10 enheter/kg kroppsvekt.

Mest foretrukket omfatter de terapeutiske og profylaktiske blandinger, en dosering på mellom omkring 5 nmol/kg kroppsvekt og omkring 250 nmol/kg kroppsvekt av trombininhibitoren. Mest foretrukne kombinasjoner omfatter den samme

20 mengde av trombininhibitoren, og mellom omkring 10% og 70% av det vanlige doseringsområde for et trombolytisk middel. Det bør også bli forstått at en daglig farmasøytisk effektiv dose av enten trombininhibitorene ifølge foreliggende

oppfinnelse, eller det trombolytiske middel som er tilstede

25 i blandingene ifølge foreliggende oppfinnelse, kan være mindre enn eller større enn de spesielle områder som er angitt ovenfor.

Når forbedring i pasientens tilstand har inntruffet, blir en opprettholdelsesdose av en kombinasjon eller blanding

30 ifølge foreliggende oppfinnelse, tilført om nødvendig. Derpå kan doseringen eller tilførselsfrekvensen eller begge deler bli redusert som en funksjon av symptomene, til et

nivå hvor den forbedrede tilstand blir opprettholdt. Når symptomene har blitt bedret til det ønskede nivå, bør

35 behandling stoppes. Pasienter kan imidlertid behøve inter-

mitterende behandling ved ny oppblussing av sykdomssymptomer.

I henhold til en alternativ utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, kan trombininhibitorer bli brukt i blandinger og metoder for å belegge overflatene av invasive anordninger, noe som resulterer i en lavere risiko for proppdannelse eller blodplateaktivering hos pasienter som mottar slike anordninger. Overflater som kan bli belagt med blandingene ifølge foreliggende oppfinnelse, innbefatter feks. proteser, kunstige ventiler, vaskulære innpodinger, stentere og katetere. Metoder og sammensetninger for å belegge disse anordninger er kjent for fagmannen. Disse innbefatter kjemisk kryssbinding eller fysisk absorpsjon av de trombininhibitor-inneholdende blandinger til overflatene av anordningene.

I henhold til en ytterligere utførelsesform av foreliggende oppfinnelse, kan trombininhibitorer bli brukt for ex vivo trombeavbildning i en pasient. I denne utførelsesformen blir trombininhibitoren merket med en radioisotop. Valget av radioisotop er basert på et antall velkjente faktorer, feks. toksisitet, biologisk halveringstid og påviselighet. Foretrukne radioisotoper innbefatter, men er ikke begrenset til ^{125}I , ^{123}I og ^{111}In . Teknikker for merking av trombininhibitor er velkjent i faget. Mest foretrukket er radioisotopen ^{123}I , og merkingen blir oppnådd ved å bruke ^{123}I -Bolton-Hunter reagens. Den merkede trombininhibitor blir tilført til en pasient og tillatt å binde seg til trombinet, inneholdt i blodproppen. Blodproppen blir nå observert ved å bruke velkjente påvisningsanordninger, såsom et kamera som er i stand til å påvise radioaktivitet koblet til et computerbildedannende system. Denne teknikk gir også bilder av blodplatebundet trombin og meizotrombin.

Foreliggende oppfinnelse angår også blandinger inneholdende trombininhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, samt metoder for å bruke slike blandinger ved behandling av

tumormetastaser. Effektiviteten av trombininhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, for behandlingen av tumor-
metastaser, er manifisert ved inhiberingen av metastase-
vekst. Dette er basert på tilstedeværelsen av et prokoagu-
5 leringsenzym i visse kreftceller. Dette enzym aktiverer
omdannelsen av Faktor X til Faktor Xa i koaguleringskaska-
den, noe som resulterer i fibrinavleiring som i sin tur
virker som et substrat for tumorvekst. Ved å inhibere
fibrinavleiring via inhiberingen av trombin, virker mole-
10 kylene ifølge foreliggende oppfinnelse som effektive anti-
metastatiske tumormidler. Eksempler på metastatiske tumorer
som kan bli behandlet med trombininhibitorene ifølge fore-
liggende oppfinnelse, innbefatter, men er ikke begrenset
til hjernekarzinomer, leverkarzinomer, lungekarzinomer,
15 osteo-karzinomer og neoplastiske plasmacellekarzinomer.

Oppfinnelsen angår også fremgangsmåter og blandinger som
anvender de ovenfor beskrevne trombininhibitorer for å
hemme trombinindusert endotelial celleaktivering. Denne
inhibering innbefatter undertrykkelsen av blodplateakti-
20 veringsfaktor (PAF) syntese av endotelialceller. Disse
blandinger og metoder har viktige anvendelser ved be-
handlingen av sykdommer, særpregget ved trombinindusert
inflammasjon og ødem som er antatt å bli fremmet av PAF.
Slike lidelser innbefatter, men er ikke begrenset til
25 voksent pustevanskesyndrom, septisk sjokk, septisemi og
reperfusjonskade.

Tidligere trinn av septisk sjokk innbefatter lokale, akutte
inflammatoriske og koagulopatiske responser. Det har tid-
ligere blitt vist at injeksjon i bavianer med en dødelig
30 dose av levende E. coli fører til markert senkning i
neutrofiltall, blodtrykk og hematokritt. Endringer i
blodtrykk og hematokritt er delvis grunnet dannelsen av en
disseminert intravaskulær koagulopati (DIC) og har blitt
vist å tilsvare forbruk av fibrinogen [F.B. Taylor et al.,
35 "Protein C Prevents the Coagulopathic and Lethal Effects of
E. coli Infusion in the Baboon", J.Clin.Invest., 79, s 918-

25 (1987)]. Neutropeni er grunnet den alvorlige inflammatoriske respons forårsaket av septisk sjokk, som resulterer i markert økning i tumornekrose-faktornivå. Trombininhibitorerne ifølge foreliggende oppfinnelse, kan bli brukt i 5 blandinger og metoder for å behandle eller forhindre DIC i sepsis og andre lidelser.

Foreliggende oppfinnelse angår også bruken av ovenfor beskrevne trombininhibitorer, eller blandinger inneholdende disse som anti-koaguleringsmidler for utenomlegemlig blod. 10 Som brukt heri innbefatter uttrykket "utenomlegemlig blod" blod som er fjernet i rør fra en pasient utsatt for utenomlegemlig behandling, og så ført tilbake til pasienten i slike prosesser som dialyseprosesser, blodfiltrering eller blodbypass under kirurgi. Uttrykket innbefatter også blod- 15 produkter som lagres utenomlegemlig for eventuell tilførsel til en pasient, samt blod samlet opp fra en pasient som skal bli brukt for forskjellige assays. Slike produkter innbefatter fullblod, plasma eller enhver blodfraksjon hvor inhibering av koaguleringen er ønsket.

20 Mengden eller konsentrasjonen av trombininhibitorer i disse typer blandinger er basert på blodvolumet som skal behandles, eller mer foretrukket, dets trombininnhold. Fortrinnsvis ligger en effektiv mengde av en trombininhibitor ifølge foreliggende oppfinnelse, for å forhindre koagulering i 25 utenomlegemlig blod, fra omkring 0,5 nmol/60 ml utenomlegemlig blod til omkring 2,5 μ mol/60 ml utenomlegemlig blod.

Trombininhibitorerne ifølge foreliggende oppfinnelse, kan også bli brukt for å hemme blodproppbundet trombin som er 30 antatt å fremme proppansamling. Dette er spesielt viktig fordi vanlig brukte anti-trombinmidler, såsom heparin og lavmolekylvektsheparin, er ineffektive mot blodproppbundet trombin.

Endelig kan trombininhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse, bli anvendt i blandinger og metoder for å behandle neurodegenerative lidelser. Trombin er kjent for å forårsake neuritt-tilbaketrekning, en prosess som antyder
5 avrundingen i formendringer hos hjerneceller og som er implikert i neurodegenerative lidelser, såsom Alzheimer's sykdom og Parkinsons's sykdom.

For at oppfinnelsen, som er beskrevet heri, skal bli mer fullstendig forstått, er de følgende eksempler angitt. Det
10 bør være underforstått at disse eksempler er for illustratoriske formål alene, og skal ikke bli ansett som å begrense foreliggende oppfinnelse på noen måte.

EKSEMPEL 1

Utarbeidelse av en trombininhibitor som er i stand til å
15 blokkere det katalytiske sete, og binde til det anionbindende eksosete

Karboksyterminale hirudinpeptider blokkerer effektivt trombinkatalysert fibrinogenhydrolyse, men ikke kromogen substrathydrolyse [J.M. Maraganore et al., J. Biol. Chem. 264, s. 8692-98 (1989)]. I tillegg nøytraliserer hirudinpeptider
20 ikke trombinkatalysert aktivering av Faktor V og VIII [J.W. Fenton, II, et al., "Hirudin Inhibition by Thrombin", Angio. Archiv. Biol., 18. s. 27 (1989)].

Hirudinpeptider, såsom Tyr₆₃-O-sulfat-N-acetyl-hirudin₅₃₋₆₄ ("higugen"), oppviser kraftige inhibitoriske effekter mot trombinindusert blodplateaktivering in vitro [J.A. Jakubowski og J.M. Maraganore, "Inhibition of Thrombin-Induced Platelet Activities By A Synthetic 12 Amino Acid Residue Sulfated Peptide (Hirugen)", Blood, s. 1213 (1989)]. Ikke
30 desto mindre kan en trombininhibitor som er i stand til å blokkere det aktive sete, være nødvendig for inhibering av blodplatetrombose in vivo, dersom aktivering av Faktor V og VIII er kritiske og hastighetsbegrensende trinn. Denne kon-

klusjonen stammer fra resultater, erholdt med den irreversible trombininhibitor (D-Phe)-Pro-Arg-CH₂Cl [S. R. Hanson og L. A. Harker, "Interruption of Acute Platelet-Dependent Thrombosis by the Synthetic Antithrombin D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Arginyl Chloromethyl Ketone", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, s. 3184-88 (1988)] og andre reversible trombininhibitorer [J.F. Eidt et al., "Thrombin is an Important Mediator of Platelet Aggregation in Stenosed Canine Coronary Arteries with Endothelial Injury", J. Clin. Invest., 84, s. 18-27 (1989)].

Ved å bruke den ovennevnte kunnskap om at NH₂-terminalen av hirudinpeptider er proksimal til Lys-149, anvendte søker en tredimensjonal modell av trombin [B. Furie, et al., "Computer-Generated Models of Blood Coagulation Factor Xa, Factor IXa, and Thrombin Based Upon Structural Homology with Other Serine Proteases", J. Biol. Chem., 257, s. 3875-82 (1982)] for å utarbeide et middel som: 1) binder til det anionbindende eksosete av trombin; og 2) er i stand til å blokkere den aktive sidelomme av trombin og inhibere funksjonen til de katalytiske residuer inneholdt deri.

Søker bestemte at den minste avstanden fra ε-NH₂ til Lys-149 til β-hydroksylatet av Ser-195 er 18-20 Å. Basert på en 3Å/aminosyre-residuumlengde, regnet søker ut at minst omkring 4 - 7 aminosyrer ville være nødvendig for å sammenknytte et hirudinpeptid, såsom Tyr₆₃-O-sulfat-hirudin₅₃₋₆₄, til et domene omfattende en aktiv seteinhibitorstruktur. Sammensetningen av linkerene ble utarbeidet til å være glysin. Glysin ble valgt for å fremskaffe den største fleksibilitet til en linker for disse foreløpige undersøkelser. Det bør imidlertid bli forstått at andre, stivere biopolymerlinkere også kan bli anvendt.

Søker valgte sekvensen (D-Phe)-Pro-Arg-Pro som den aktive seteinhibitor fordi trombin oppviser spesifisitet for Arg som P₁-aminosyren i spaltningen av substrater. Et Pro etter Arg (P₁' aminosyren) gir en binding som spaltes meget sakte

av trombin. Søker utarbeidet alternative peptider ved å erstatte dette Pro med en sarkosyl- eller N-metyl-alanin aminosyre eller ved kjemisk reduksjon av en Arg-Gly spaltbar binding.

5 EKSEMPEL 2

Syntese av Hirulog-8

Hirulog- (har formelen: H-(D-Phe)-Pro-Arg-Pro-(Gly)₄-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH. Søker syntetiserte Hirulog-8 ved konvensjonell fastfase-peptidsyntese ved å anvende en Applied Biosystems 430 A peptidsyntetisator. Dette peptid ble syntetisert ved å bruke BOC-L-Leusin-O-divinylbenzenresin. Ytterligere t-BOC-aminosyrer (Peninsula Laboratories, Belmont, CA) som ble brukt, innbefattet (BOC-O-2,6-diklobenzyl-tyrosin, BOC-L-glutaminsyre (γ-benzylester), BOC-L-prolin, BOC-L-isoleucin, BOC-L-fenylalanin, BOC-L-asparaginsyre (β-benzylester), BOC-glysin, BOC-L-asparagin, BOC-D-fenylalanin, og BOC-L-arginin. For å oppnå høyere utbytte ved syntese, ble (Gly)-linkersegmentet festet til to cykler av manuell addisjon av BOC-glycylglysin (Beckman Biosciences, Inc., Philadelphia, PA). Etter avsluttet syntese ble peptidet fullstendig deblokkert og frakoblet fra divinylbezenresinet ved behandling med vannfri HF: p-kresol: etylmetylsulfat (10:1:1, v/v/v). Etter fjerning fra resinet, ble peptidet frysetørket til tørrhet.

Uren Hirulog-8 ble rensed med revers-fase HPLC ved å bruke et Applied Biosystems 151A væskechromatografisk system og en Vydac C₁₈ kolonne (2,2 x 25 cm). Kolonnen ble ekvilibrert i 0,1% TFA/vann og behandlet med en lineær gradient med økende acetonitril-konsentrasjon fra 0 - 80% i løpet av 45 min. i 0,1% TFA ved en strømningshastighet på 4,0 ml pr. min. Effluentstrømmen ble overvåket for absorbens ved 229 nm og fraksjoner ble samlet opp manuelt. Søker renst 25 -

30 mg uren Hirulog-8 med HPLC og gjenvant 15 -20 mg rent peptid.

Søker bekreftet strukturen av rensset Hirulog-8 med amino-
syre og sekvensanalyse. Aminosyrehydrolysater ble fremstilt
5 ved å behandle peptidet med 6 N HCl, in vacuo, ved 110°C i
24 timer. Hydrolysaten ble så analysert med ionebytterkro-
matografi og etterfølgende ninhydrinderivatisering/-
påvisning ved å bruke en Beckman 6300 automatisk analy-
sator. Søker utførte sekvensanalyse ved å bruke automatisk
10 Edman-degradering på en Applied Biosystems 470A gassfase-
sekvensator, utstyrt med et Model 900A datasystem. Fenyl-
tiohydantoin (PTH)-aminosyrer ble analysert on-line ved å
bruke en Applied Biosystems 120A PTH-analysator og en PTH-
C₁₈-kolonne (2,1 x 220 mm).

15 EKSEMPEL 3

Utarbeidelse av 1- og 2-posisjonen substituerte hiruloger

Søker oppnådde den røntgenstråle-krystallografiske struktur
av Hirulog-8:trombinkomplekset ved de følgende trinn. Først
dannet søker Hirulog-8:trombinkompleks-krystaller av
20 passende kvalitet for å erholde et høyopløsningsdiffrak-
sjonsmønster. Søker samlet derpå opp fraktometerdata ved å
anvende disse krystaller. Endelig bestemte søker den tre-
dimensjonale struktur til Hirulog-8:trombinkomplekset ved å
bruke molekulære erstatningsrotasjons/translasjonsmetoder
25 ved å anvende koordinatene til PPACK:trombin [W.Bode et
al., "The Refined 1,9 Å Crystal Structure of Human α -Throm-
bin: Interaction With D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketone and
Significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp Insertion Segment",
EMBO J., 8, s. 3467-75 (1989)] og hirudin:trombin [T.J.
30 Rydel et al., "The Structure of a Complex of Recombinant
Hirudin and Human α -Thrombin", Science, 249, s. 277-80,
(1990)] kompleks. Som vist i figur 1 ble strukturen til
Hirulog-8 bundet til trombin funnet, noe som tillot frem-

skaffelse av D-Phe-Pro-Arg-sekvensen til CSDM og Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-segmentet av ABEAM.

I figur 1 er trombin og dets aktive sete vist. Hirulog-8 er vist. Den venstre del av Hirulog-8 nærmeste det trombinaktive sete, er CSDM. Den høyre del er ABEAM. Andre aminosyrer av Hirulog-8 er ikke vist i figur 1, fordi elektronegativitet tilsvarende disse ikke kunne bli benyttet.

Undersøkelse av ABEAM-delen av Hirulog-8:trombinstrukturen viste plasseringen av 1-posisjon aminosyren (D-Phe) i en hydrofob lomme dannet av His57, Tyr60A, Trp60D, Leu99, Ile174 og Trp215 av trombin. D-Phe residuet dannet nære van der Waals kontakter med Leu99, Ile174 og Trp215 (figur 2). I figur 2 er trombin og Hirulog-8 vist.

Plasseringen av D-Phe residuet i lommen antydnet at substitusjoner ved 1-posisjonen som øker lipofile kontakter, ville føre til en øket bindingsaffektivitet av CSDM-enheten i trombininhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse. Følgelig erstattet søker D-Phe residuet av Hirulog-8 med enten D-naptylalanin (D-NPA) eller D-cykloheksylalanin (D-Cha) for å danne henholdsvis D-NPA-Hirulog-8 og D-Cha-Hirulog-8.

Bindingen av CSDM av Hirulog-8 til det katalytiske sete av trombin, ble også funnet å innbefatte apolare interaksjoner mellom det første prolin av inhibitoren (ved siden av D-Phe), og en lomme definert av His57, Tyr60A og Trp60D av trombin (figur 3). Videre ble dette prolin funnet å ligge innenfor 3,46 Å av den fenoliske hydroksylgruppe av trombin Tyr60A (figur 3, stiplet linje). I figur 3 er trombin og Hirulog-8 vist.

Nærheten av dette prolin til Tyr60A av trombin, antydnet potensiale for hydrogenbindingsdannelse mellom de to. Ved å substituere prolin med en aminosyre som er i stand til å danne hydrogenbindinger, kan stabiliteten av CSDM bindingen

til det trombinaktive sete bli øket. Dette ville i sin tur øke den inhibitoriske aktivitet av et slikt molekyl. Følgelig erstattet søker prolinet av Hirulog-8 med enten L-histidin (His₂-Hirulog-8), L-tioprolin (TPro₂-Hirulog-8) eller isonipekotinsyre (Inp₂-Hirulog-8). Hver av disse substitusjoner dannet en hydrogenbindingsakseptor ved 2-posisjonen (R₄ komponent) av trombininhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse (dvs. henholdsvis et imidazol-nitrogen, en tiol og et karboksylat).

10 EKSEMPEL 4

Syntese av 1-posisjonssubstituerte hiruloger

D-Npa-Hirulog-8 ble syntetisert på samme måte som Hirulog-8 (eksempel 2), bortsett fra at Boc-D-naftylalanin (Bachem Inc., Torrance, CA) ble anvendt i stedet for D-Phe ved siste syklus av syntesen. D-Cha-Hirulog-8 ble på lignende måte fremstilt ved å bruke Boc-D-cykloheksylalanin (Bachem Biosciences, Philadelphia, PA) ved siste syklus av syntesen.

Begge 1-posisjonssubstituerte peptider ble rensert som beskrevet for Hirulog-8 i eksempel 2. De rensede peptider ble karakterisert med aminosyreanalyse og med FAB-MS.

EKSEMPEL 5

Syntese av 2-posisjon-substituerte hirulogderivater

Substitusjoner ved 2 posisjonen ble utarbeidet med følgende formel: (D-Cha)-X-Arg-HPro-(Gly)₄-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu eller (D-Phe)-X-Arg-HPro-(Gly)₄-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu, hvor X enten er histidin, tioprolin eller isonipekotinsyre. Disse peptider syntetiseres i hovedsak som beskrevet i eksempel 2 og eksempel 4, bortsett fra innbefattelsen av Boc-L-hydrok-syprolin (Bachem, Inc.) i stedet for Boc-L-prolin ved

cyklus 16 av syntesen og enten Boc-N-im-CBZ-L-histidin, Boc-L-tioprolin eller Boc-isonipekotinsyre (alle erholdt fra Bachem, Inc.) i stedet for Boc-L-prolin ved cyklus 18. HPro blir brukt ved 4-posisjonen for å senke spaltnings-
5 hastigheten av inhibitoren av trombin. Peptidene blir rensset og karakterisert som beskrevet i eksempel 2.

EKSEMPEL 6

Karakterisering av anti-trombin-aktiviteter av 1-posisjon-substituerte hirologer

10 Søker sammenlignet inhiberingen av trombinkatalysert hydrolyse av Spectrozyme TH (tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilid; American Diagnostica, New York, NY) av Hirulog-8, D-Cha-Hirulog-8 og D-Npa-Hirulog-8 i et assay. Spesielt målte søker de opprinnelige hastighetsgrader i nærvær eller
15 fravær av hver inhibitor over et område av substratkonsentrasjoner fra 2,2 - 22 μM . Den trombinkatalyserte hastighet ble overvåket i et Cary 19 spektrofotometer ved 405 nm og nedtegnet kontinuerlig som en funksjon av tiden. Kinetiske målinger ble utført ved romtemperatur ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) i en 0,05
20 M natriumboratbuffer, pH 8,4, inneholdende 0,1 M NaCl.

For en typisk enzymreaksjon ble 1,0 ml buffer tilsatt til både prøve og referansekuvertene. Trombin ($3,2 \times 10^{-9}\text{M}$, endelig konsentrasjon) og hirulogen ($0 - 4 \times 10^{-8}\text{M}$) ble tilsatt til prøvekuvetten før tilsetning av Spectrozyme TH
25 (2,2 - 22 μM). Umiddelbart etter tilsetning av substrat ble innholdet av prøvekuvetten blandet ved å bruke en plastpipette. Reaksjonen ble overvåket spektrofotometrisk i 5 - 15 min.

Opprinnelig hastighetsgrad ved hver substratkonsentrasjon
30 ble uttrykt som mol Spectrozyme TH hydrolysert/sek/mol trombin. Dette ble bestemt under den initielle lineære fase av reaksjonen ($\approx 15\%$ total hydrolyse av substrat) ved å måle vinkelen av den hydrolytiske reaksjon. Lineweaver-

Bruke-diagrammer ble følgelig konstruert ved å nedtegne den inverse av den opprinnelige hastighet mot den inverse av substratkonsentrasjonen. Vist nedenfor er de inhibitoriske konstanter, som er erholdt for Hirulog-8 og derivater, av foreliggende oppfinnelse.

<u>Derivative</u>	<u>K_i nM</u>
Hirulog-8	1,4
D-Cha-Hirulog-8	0,12
D-Npa-Hirulog-8	4,3

10 Som det kan observeres fra disse resultater, resulterer substitusjonen av D-Phe i Hirulog-8 med D-Cha i en overraskende og uventet minkning i K_i med en størrelsesorden. Dette funn indikerer at substitusjonen av D-Phe med D-Cha øker bind-ingsaffiniteten av CSDM i inhibitorene ifølge foreliggende oppfinnelse. Denne mangel av D-Npa-Hirulog-8 til å øke K_i, indikerer at tilstedeværelsen av en mettete ringstruktur ved denne posisjon forårsaker den økede bindingsaffinitet. D-Cha inneholder en slik mettete ring, mens D-Npa inneholder en umettete ring.

20 EKSEMPEL 7

Anti-koaguleringsaktivitet av A₁-substituerte hiruloger

Søker sammenlignet anti-koaguleringsaktiviteten av Tyr₆₃-O-sulfat-N-acetyl-hirudin₅₃₋₆₄ ("hirugen"), rekombinant hiru-din (American Diagnostica), Hirulog-8, og de 1-posisjonssubstituerte hiruloger ifølge foreliggende oppfinnelse, ved å bruke sammenslått, normalt humant plasma (George King Biomedical, Overland Park, KA) og et Coag-A-Mate XC instrument (General Diagnostics, Organon Technica, Oklahoma City, OK). Aktivitet ble overvåket ved å bruke det aktiviterete partielle tromboplastin (APTT) tidsassay med CaCl₂ og fosfolipid-oppløsninger, erholdt fra forhandler. Rekombinant hirudin (American Diagnostica), Hirulog-8, D-

Cha-Hirulog-8 eller hirugen ble så tilsatt til APTT bestemmelsesbrønnene ved en endelig konsentrasjon på 10 - 32.300 ng/ml i et totalt volum på 25 µl før tilsetning av 100 µl plasma.

- 5 Som vist i figur 4, forlenget D-Cha-Hirulog-8 APTT til 470% i forhold til kontrollverdiene ved en konsentrasjon på 1 µg/µl. Denne økning var signifikant større enn økningene i APTT forårsaket av hirugen, rekombinant hirudin eller Hirulog-8 ved samme konsentrasjon. Således, i tillegg til å
- 10 vise økede anti-trombinaktiviteter in vitro i forhold til Hirulog-8, viste D-Cha-Hirulog-8 også en signifikant anti-koagulerings-effekt i plasma assays i forhold til Hirulog-8.

Selv om søker ovenfor har presenterte et antall utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse, er det klart at søkers

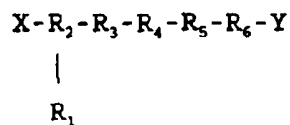
15 grunnleggende konstruksjon kan bli endret for å gi andre utførelsesformer som utnytter molekylene, blandingene, kombinasjonene og metodene ifølge foreliggende oppfinnelse. Følgelig vil det bli forstått at omfanger av foreliggende oppfinnelse skal defineres ved kravene som følger dette, i

20 stedet for de spesielle utførelsesformer som har blitt presentert ovenfor som eksempler.

P a t e n t k r a v

1. Trombininhibitor omfattende

a) en katalytisk sete-rettet enhet som utgjøres av formelen:

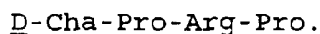


- 5 hvor X er hydrogen eller er særpreget ved å være en stammekjede som omfatter fra 1 til 100 atomer; R₁ er valgt fra gruppen omfattende usubstituerte, monosubstituerte, disubstituerte og trisubstituerte mettede homocykliske ringstrukturer med 6 atomer;
- 10 R₂ er en stammekjede som består av fra 1 til 5 atomer;
R₃ er en binding eller er en stammekjede som består av fra 1 til 3 atomer;
R₄ er enhver aminosyre;
R₅ er enhver L-aminosyre som omfatter en guanidin- eller
- 15 aminoinneholdende sidekjedegruppe;
R₆ er en ikke-amidbinding; og
Y er en stamme som består av fra 1 til 9 atomer; og
- b) en linker enhet som har en stammekjede med en utregnet lengde på mellom 18 Å og omkring 42 Å; og
- 20 c) en anionbindende eksosete-assosierende enhet, hvor nevnte katalytiske seterettede enhet er bundet til nevnte anionbindende eksosete-assosierende enhet via i b) nevnte linker-enhet, og hvor nevnte inhibitor er i stand til samtidig å binde til det katalytiske sete og det anion-
- 25 b i n d e n d e e k s o s e t e h o s t r o m b i n ;
k a r a k t e r i s e r t v e d a t n e v n t e i n h i b i t o r h a r e n ø k e t l i p o f i l i n t e r a k s j o n m e d t r o m b i n i f o r h o l d t i l i n t e r a k s j o n e n m e l l o m t r o m b i n o g (D - P h e) - P r o - A r g - P r o - (G l y) 4 -

Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu og hvor nevnte økede lipofile interaksjon er grunnet R_1 .

2. Trombininhibitor ifølge krav 1 hvor X er H_2N ; R_1 er valgt fra gruppen omfattende usubstituert, monosubstituert, 5 disubstituert og trisubstituert heksan; R_2 er CH_2-CH ; og R_3 er $C=O$.

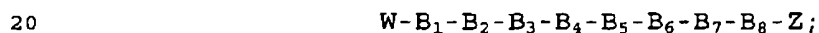
3. Trombininhibitor ifølge krav 1 eller 2 hvor den katalytiske seterettede enhet har aminosyresekvensen:



10 4. Trombininhibitor ifølge krav 1 eller 2, hvor R_4 er enhver aminosyre som omfatter en sidekjedegruppe som har kapasiteten å akseptere en hydrogenbinding ved en pH på mellom omkring 5,5 og 9,5.

15 5. Trombininhibitor ifølge krav 1, 2 eller 4, hvor R_4 er valgt fra gruppen omfattende histidin, tioprolin og isonipekotinsyre.

6. Trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1 til 5, hvor nevnte anionbindende eksosete-assosierende enhet utgjøres av formelen:



hvor W er en binding; B_1 er en anionisk aminosyre; B_2 er enhver aminosyre; B_3 er Ile, Val, Leu, Nle eller Phe; B_4 er Pro, Hyp, 3,4-dehydroPro, tiazolidin-4-karboksylat, Sar, enhver N-metylaminosyre eller D-Ala; B_5 er en anionisk 25 aminosyre; B_6 er en anionisk aminosyre; B_7 er en lipofil aminosyre valgt fra gruppen omfattende Tyr, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha, Pro, eller et dipeptid bestående av en av disse lipofile aminosyrer samt enhver annen aminosyre; B_8 er en binding eller en peptidinnholdende form av en til

fem residuer av enhver aminosyre; og Z er OH eller har en stammekjede som består av fra 1 til 6 atomer.

7. Trombininhibitor ifølge krav 6 hvor B₁ er Glu; B₂ er Glu; B₃ er Ile; B₄ er Pro; B₅ er Glu; B₆ er Glu; B₇ er Tyr-Leu, Tyr(SO₃H)-Leu, Tyr(OSO₃H)-Leu eller (3-, 5-dijodTyr)-Leu; B₈ er en binding, og Z er OH.

8. Trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1 til 7, hvor nevnte stamme hos linkerenheten utgjøres av enhver kombinasjon av atomer valgt fra gruppen omfattende karbon, nitrogen, svovel og oksygen.

9. Trombininhibitor ifølge krav 8 hvor nevnte linker-utgjøres av aminosyresekvensen:

Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe.

10. Trombininhibitor ifølge krav 9, hvor den er trombininhibitoren D-Cha-Hirulog-8.

11. Trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1 til 10 som ytterligere omfatter en radioisotop.

12. Trombininhibitor ifølge krav 11, hvor nevnte radioisotop er valgt fra gruppen omfattende ¹²³I, ¹²⁵I og ¹¹¹In.

13. Farmasøytisk sammensetning omfattende en farmasøytisk effektiv mengde av en trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1 til 10 samt eventuelt et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel.

14. Farmasøytisk akseptabel sammensetning ifølge krav 13, hvor den farmasøytisk effektive mengde ligger mellom omkring 0,5 nmol/kg kroppsvekt/dag til omkring 2,5 μmol/kg kroppsvekt/dag.

15. Farmasøytisk akseptabel sammensetning ifølge krav 14, hvor den farmasøytisk effektive mengde ligger mellom omkring 5 nmol/kg kroppsvekt/dag til omkring 250 nmol/kg kroppsvekt/dag.

5 16. Sammensetning for ex vivo avbildning av en fibrin- eller blodplatetrombus hos et individ, hvor nevnte sammensetning omfatter en farmasøytisk akseptabel buffer samt en trombininhibitor ifølge krav 11 eller 12.

10 17. Fremgangsmåte ved ex vivo avbildning av en fibrin- eller blodplatetrombus hos et individ omfattende trinnene:

(a) å administrere til nevnte individ sammensetningen ifølge krav 16; og

(b) anvende påvisningsinnretninger for å observere trombininhibitoren som er tilstede i nevnte sammensetning.
15

18. Sammensetning for å belegge en overflate hos en invasiv anordning som skal innføres i en pasient hvor nevnte sammensetning omfatter en egnet buffer samt minst en trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1 til 10.

20 19. Fremgangsmåte ved belegging av overflaten av en invasiv anordning som skal ettes inn i en pasient, hvor fremgangsmåten omfatter trinnet å sette nevnte overflate i kontakt med sammensetningen ifølge krav 18.

25 20. Farmasøytisk effektiv kombinasjon omfattende en trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1 til 10, et trombolytisk middel samt et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel.

30 21. Farmasøytisk effektiv kombinasjon ifølge krav 20 hvor nevnte trombininhibitor er D-Cha-Hirulog-8 og nevnte trombolytiske middel er tPA.

22. Kombinasjon ifølge krav 20 eller 21, hvor den daglige dose av nevnte trombininhibitor er mellom omkring 0,5 nmol/kg kroppsvekt og omkring 2,5 μ mol/kg kroppsvekt, og hvor den daglige dose av nevnte trombolytiske middel er mellom omkring 10% og omkring 80% av det konvensjonelle doseområde for nevnte trombolytiske middel.

23. Kombinasjon ifølge ethvert av kravene 20 til 22, hvor den daglige dose av nevnte trombininhibitor er mellom omkring 5 nmol/kg kroppsvekt og omkring 250 nmol/kroppsvekt, og hvor den daglige dose av nevnte trombolytiske middel er mellom omkring 10% og omkring 70% av det konvensjonelle doseområde av nevnte trombolytiske middel.

24. Anvendelse av trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1-10 ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for å inhibere en trombin-mediert eller trombin-assosiert funksjon eller prosess hos et individ eller i utenomlegemlig blod, trombe-ansamling hos et individ forårsaket av aggregat-bundet trombin eller blodplate-avhengig trombe hos et individ, ved behandling av en neurodegenerativ sykdom hos et individ eller ved behandling eller forebygging av disseminert intravaskulær koagulering hos et individ.

25. Anvendelse av en trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1 - 10 i kombinasjon med et trombolytisk middel ved fremstilling av en farmasøytisk kombinasjon for å etablere reperfusjon eller for å forhindre reokklusjon hos et individ.

26. Anvendelse av en trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1 - 10 ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning til å minske reperfusjonstiden og øke reokklusjonstiden hos et individ behandlet med et trombolytisk middel.

27. Anvendelse av trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1-10 for å danne en farmasøytisk sammensetning som er egnet for å inhibere veksten av en metastatisk svulst hos et individ.
- 5 28. Anvendelse ifølge krav 27, hvor den metastatiske svulst er valgt fra gruppen omfattende hjernekarzinom, lungekarzinom, leverkarzinom, osteokarzinom og neoplastisk cellekarzinom.
29. Anvendelse av trombininhibitor ifølge ethvert av
10 kravene 1-10 for å danne en farmasøytisk sammensetning som er egnet for å behandle eller forhindre trombin-indusert inflammasjon hos et individ.
30. Anvendelse ifølge krav 29, hvor nevnte trombin-induserte inflammasjon er forårsaket av en sykdom valgt fra
15 gruppen omfattende respiratorisk sviktsyndrom hos voksne, septisk sjokk, septicemia og reperfusjonsskade.
31. Anvendelse av trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1-10, for å danne en sammensetning som er egnet for å behandle en trombotisk sykdom hos et individ.
- 20 32. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 24 til 30, hvor mengden av trombininhibitor er mellom 0,5 nmol/kg kroppsvekt/dag til 2,5 μ mol/kg kroppsvekt/dag.
33. Anvendelse ifølge krav 31, hvor mengden av trombininhibitor er mellom 5 nmol/kg kroppsvekt/dag til 250
25 nmol/kg kroppsvekt/dag.
34. Fremgangsmåte ved fremstilling av en trombininhibitor ifølge ethvert av kravene 1 eller 2 omfattende trinnene å:
- (a) syntetisere peptid-delen og ikke-aminosyre-delen av trombininhibitoren;

- (b) koble nevnte ikke-aminosyrekomponent til nevnte peptidiske del og eventuelt
- (c) merke trombininhibitoren med en radioisotop.

35. Fremgangsmåte ved fremstilling av en farmasøytisk sammensetning ifølge ethvert av kravene 13 til 15, eller en farmasøytisk effektiv kombinasjon ifølge ethvert av kravene 20 til 23, omfattende å tilsette trombininhibitoren ifølge ethvert av kravene 1 til 10 til et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel og eventuelt et trombolytisk middel.

1/3

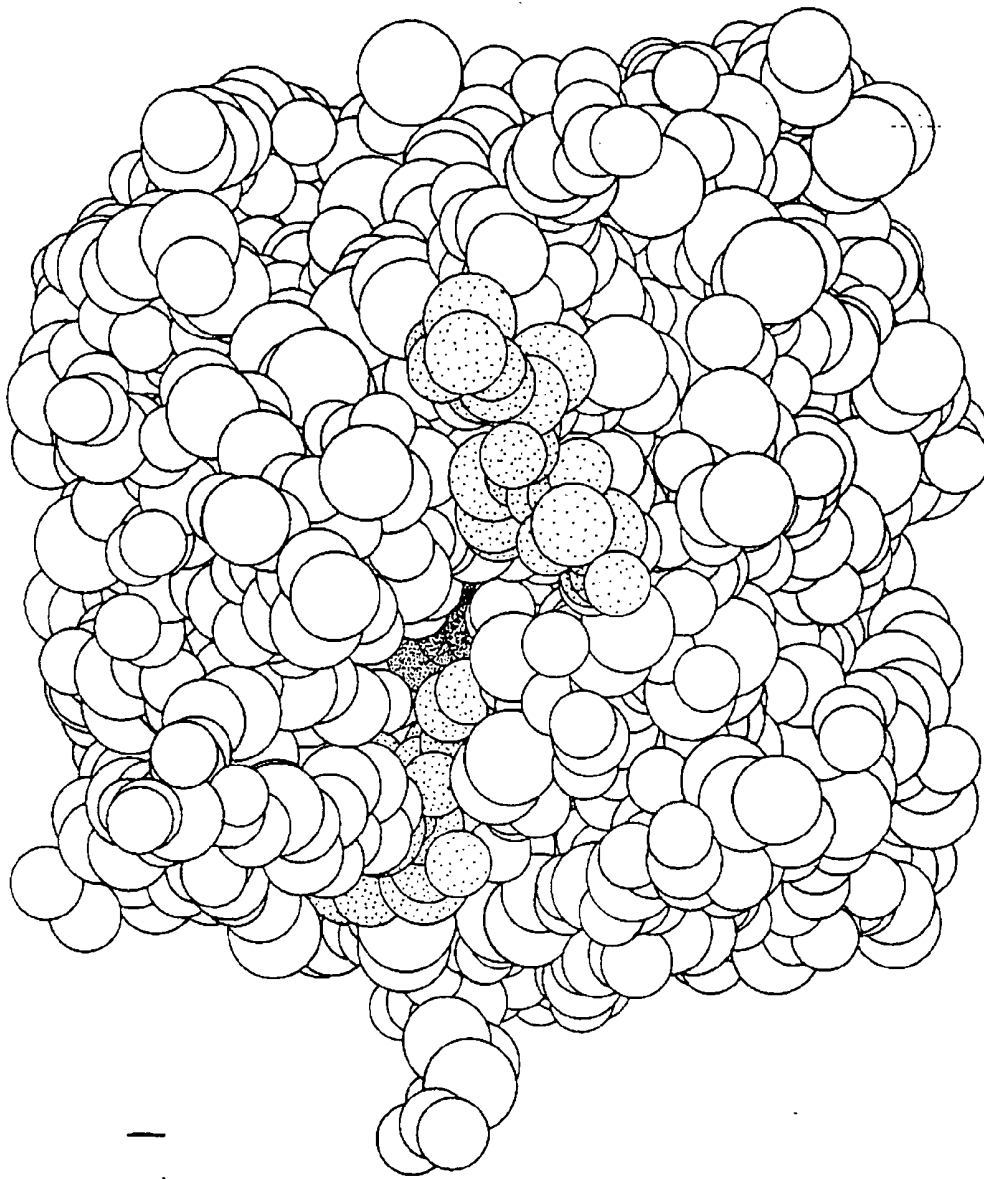


FIG. 1

2/3

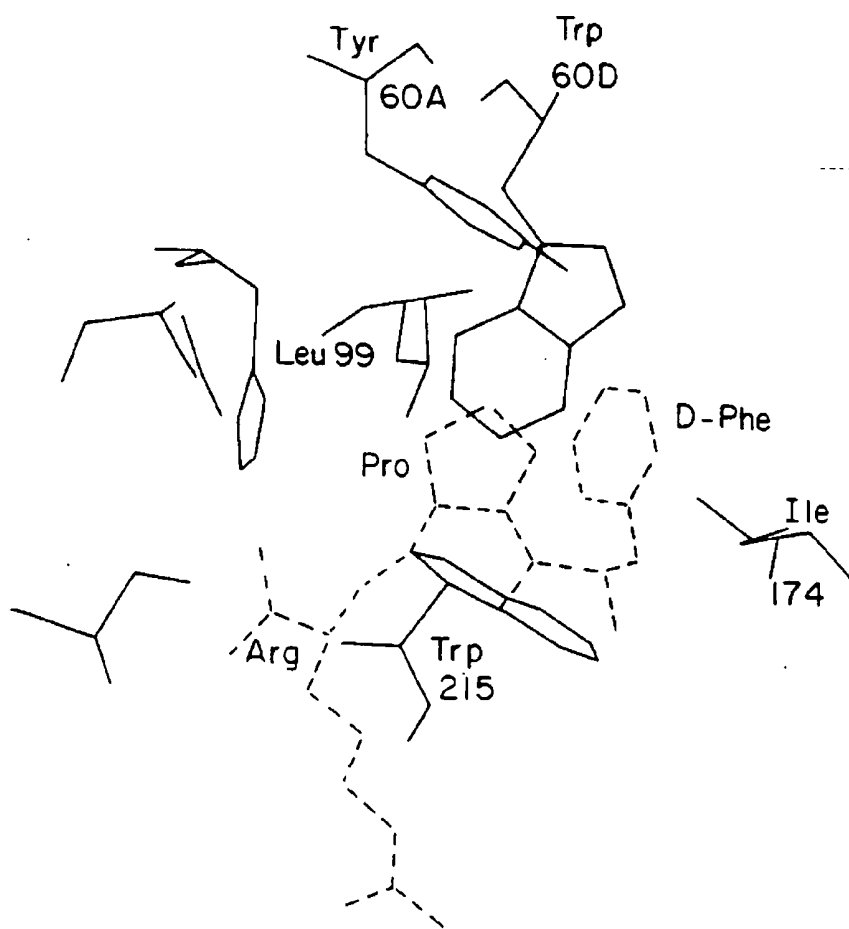


FIG. 2

3/3

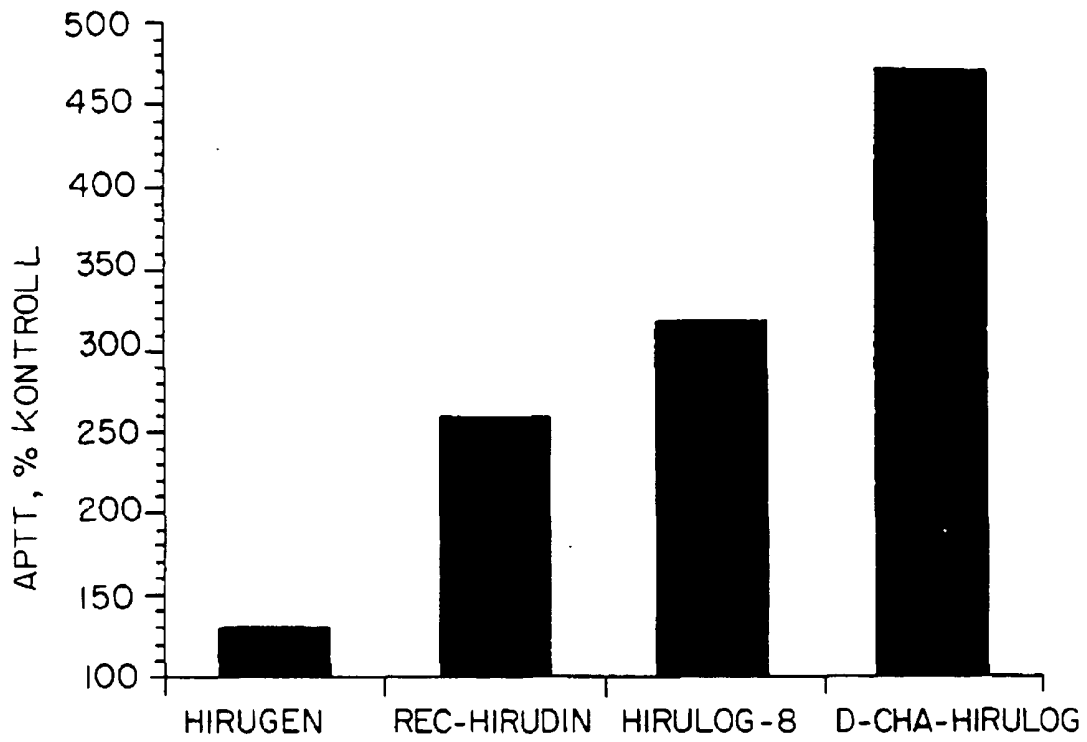


FIG. 3