

(19) C2 (11) 34436 (13) UA

(98) Юридична фірма "Грищенко та Партнери", вул. Мечнікова, 20, м. Київ-21, 01021

(85) null

(74) Льгова Майя Миколаївна, (UA)

(45) [2001-03-15]

(43) [1998-10-30]

(24) 2001-03-15

(22) 1994-03-02

(12) null

(21) 94005107

(46) 2001-03-15

(86)

(30) P4310643.9 1993-04-01 DE

(54) ЦИКЛОПЕПТИДИ ЯК ІНГІБІТОРИ АДГЕЗІЇ ТА СПОСІБ ЇХ ОДЕРЖАННЯ ЦИКЛОПЕПТИДИ КАК ІНГІБІТОРЫ АДГЕЗИИ И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ CYCLIC PEPTIDES AS ADHESION INHIBITORS AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF

(56)

(71)

(72) DE Йонціг Альфред DE Йонциг Альфред DE Jonszyk Alfred DE ХЬОЛЬЦЕМАНН Гюнтер DE Хьольцеманн Гюнтер DE Hoelzelmann Guenter DE Риппманн Фрідріх DE Риппманн Фридрих DE Rippmann Friedrich DE Діфенбах Беате DE Дифенбах Беате DE Diefenbach Beate DE Хесслер Хорст DE Хесслер Хорст DE Kessler Horst DE ХАУБНЕР Роланд DE Хаубнер Роланд DE Haubner Roland DE Вермут Йохен DE Вермут Йохен DE Wermuth Jochen DE Фелдінг-Хаберманн Брунхільд DE Фелдинг-Хаберманн Брунхильд DE Felding-Habermann Brunhilde

(73) DE МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ DE МЕРК ПАТЕНТ ГМБХ DE MERCK PATENT GMBH

Изобретение относится к новым циклопептидам формулы (I) цикло- (Arg-B-Asp-X-Y), где В, Х и Y имеют значение, указанное в п.1 формулы изобретения, и их физиологически приемлемым солям. Эти соединения действуют как ингибиторы интегрин и могут применяться для профилактики и лечения, в частности, заболеваний кровообращения, опухолевых заболеваний.

Винахід належить до нових циклопептидів формули (I) цикло- (Arg-B-Asp-X-Y), де B, X і Y мають значення, зазначені в п. 1 формули винаходу, та їх фізіологічно прийнятних солей. Ці сполуки діють як інгібітори інтегрину й можуть застосовуватися для профілактики й лікування, зокрема, захворювань кровообігу, пухлинних захворювань.

The invention relates to cyclic peptides of the formula I Cyclo-(Arg-B-Asp-X-Y) wherein B, X and Y have the meaning stated in Claim 1, and to salts thereof. These compounds act as integrin inhibitors and can be used, in particular, for the prophylaxis and treatment of circulatory disorders and in tumour therapy.

Изобретение относится к новым циклопептидам формулы (I):

1. Циклопептиды общей формулы I

цикло- (Arg-B-Asp-X-Y),

где B = Gly, Ala, -NH-Q-CO-, причем Q = (C₁-C₆)-алкилен;

X = Phe, D-Phe, D-(4-Hal-Phe), D-Lys, D-Orn, D-Pro, D-Tic, D-Nal, D-Phg;

Y = Gly, Ala, D-Ala, Val, D-Val, Phe, D-Phe, Leu, D-Leu, Nle, Lys, Lys(Ac), Lys(AcSH), Orn, D-Orn;

Ac = алканоил с 1 - 10-C-атомами;

Hal = хлор, фтор, бром, йод, или их физиологически приемлемые соли/Подобные соединения известны из Pharmazie, 40 (8), 532 – 35(1985). В основу изобретения положена задача получения новых соединений с ценными свойствами, в особенности таких, которые могут применяться для приготовления лекарственных средств.

Найдено, что соединения формулы (I) и их соли обладают очень ценными свойствами. Прежде всего, они действуют как ингибиторы интегрин, причем в особенности они ингибируют взаимодействия рецепторов β_3 или β_5 -интегрин с лигандами. Особенно эффективность соединения проявляют в случае интегрина $\alpha_v \beta_3$, или $\alpha_v \beta_5$, $\alpha_{11b} \beta_3$. Это действие можно обнаружить, например, методом, который описывается J.W.Smith и др., в J.Biol.Chem. 265, 12267-12271 (1990). Дополнительно имеют место противовоспалительные эффекты. Все эти действия можно обнаружить с помощью известных из литературы методов.

Соединения можно применять в качестве лекарственных биологически активных веществ в медицине и ветеринарии, в особенности для профилактики и лечения заболеваний кровообращения, тромбоза, инфаркта сердца, атеросклероза, воспалений, апоплексии, стенокардии, опухолевых заболеваний, остеолитических заболеваний, в особенности остеопороза, ангиогенеза и рестеноза после ангиопластики. Далее, соединения можно использовать для улучшения заживления ран.

К тому же, соединения пригодны в качестве антимикробных биологически активных веществ, которые предотвращают инфекции, которые возбуждаются, например, бактериями, грибами или дрожжами. Вещества можно использовать в качестве сопутствующих антимикробных биологически активных веществ при вмешательстве в организмы, во время которых используются чужеродные вещества, как, например, биоматериалы, имплантаты, катетеры или электростимуляторы сердца. Они действуют как антисептики.

Наиболее предпочтительными, согласно изобретению, являются циклопептиды формулы I, представляющие собой

(a) Цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Lys-Val);

(b) Цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys);

(c) Цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Gly);

(d) Цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Phe);

(e) Цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu);

(f) Цикло-(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Leu).

Выше- и нижеуказанные сокращения аминокислотных остатков обозначают остатки следующих аминокислот:

Abu 4 - аминomásляная кислота

Aha 6 - аминоксáновáя кислота

Ala аланин

Asn аспарагин

Asp аспарагиновая кислота

Asp (OR) аспарагиновая кислота (β -сложный эфир)

Arg аргинин

Cha 3-циклогексилаланин

Cit литруллин

Cys цистеин

Dab 2,4-диаминомасляная кислота

Gln глутамин

Glu глутаминовая кислота

Gly глицин

His гистидин

Ile изолейцин

Leu лейцин

Lys лизин

Lys (Ac) N^ε - алканоиллизин

Lys (AcNH₂) N^ε - аминоксáноиллизин

Lys (AcSH) N^ε - меркаптоалканоиллизин

Met метионин

Nal 3-/2-нафтил-/аланин

Nle норлейцин

Orn орнитин

Phe фенилаланин

H-Hal-Phe 4-галоген-фенилаланин

Phg фенилглицин

Pro пролин

Ruа 3-/2-пиридил/-аланин
Ser серин
Tia 3-/2-тиенил/-аланин
Tic тетрагидроизохинолин-3-карбоновая кислота
Thг треонин
Trp триптофан
Tyr тирозин
Val валин

Далее, в последующем вводятся следующие обозначения:

BOC трет.-бутоксикарбонил
CBZ бензилоксикарбонил
DCCI дициклогексилкарбодиимид
DMF диметилформамид
EDCI N-этил-N'-/3-диметиламинопропил/-карбодиимидгидрохлорид
Et этил
Fmoc 9-флуоренилметоксикарбонил
HOBT 1-гидроксибензотриазол
Me метил
Mtr 4-метокси-2,3,6-триметилфенил-сульфонил
OBut трет.-бутиловый сложный эфир
OMe метиловый сложный эфир
OEt этиловый сложный эфир
POA феноксиацетил
TBTV 2-/1H-бензотриазол-1-ил/-1,1,3,3-тетраметилурунийтетрафторборат
TFK трифторуксусная кислота

Поскольку вышеуказанные аминокислоты могут находиться в нескольких энантиомерных формах, то включаются выше- и нижеуказанные, например, в виде составной части соединений формулы (I), все эти формы и также их смеси (например, DL -формы). Далее, аминокислоты, например, в виде составной части соединений формулы (I), могут содержать соответствующие само по себе известные защитные группы.

Предметом изобретения, далее, является способ получения соединения формулы (I) или одной из его солей, заключающийся в том, что пептид формулы (II):

H-Z-OH,

где Z обозначает -Arg-B-Asp-X-Y;

B-Asp-X-Y-Arg;

-Asp-{X-Y-Arg-B};

-X-Y-Arg-B-Asp или

Y-Arg-B-Asp-X-,

или реакционноспособное производное такого пептида, которые представляют собой активированный сложный эфир и которые обрабатывают циклизующим агентом, и/или основное или кислое соединение формулы (I), которые обрабатывают кислотой или основанием и получают одну из его солей.

Указанные выше и ниже остатки B, X, Y и Z имеют указанные для формул (I) и (II) значения, если не указано ничего другого.

В вышеприведенных формулах "алкил" предпочтительно обозначает метил, этил, изопропил или трет.-бутил.

Группа B предпочтительно представляет собой Gly, однако, также -HN-/CH₂/₂-CO-; -HN-/CH₂/₃-CO-; -HN-/CH₂/₅-CO или Ala. "D" предпочтительно представляет собой Phe, в особенности D-Phe, однако также 4-Nal-Phe, особенно 4-l-Phe, а также Pro, Tic, Lys, Nal или Phg, причем особенно предпочтительны D-формы.

Соответственно этому предметом изобретения являются в особенности те соединения формулы (I), в которых по меньшей мере один из указанных остатков имеет одно из вышеуказанных предпочтительных значений.

Предпочтительная группа соединений характеризуется частичной формулой (Ia), которая обычно соответствует формуле (I), где, однако:

B = Gly, -HN-(CH₂)₂-CO-, -HN-(CH₂)₃-CO-,
-HN-(CH₂)₅-CO- или Ala

X = D-Pro, D-Tic, Phe, D-Nal, D-Phg oder 4-l-Phe и

Y = Val, Lys, Gly, Ala, Phe, Leu, Lys(Ac) или Nle

Другая предпочтительная группа соединений может характеризоваться частичной формулой (Ib), которая обычно соответствует формуле (I), где, однако, B = Gly; X = D-Phe; Y = Val, Lys или Gly.

Соединения формулы (I) и также исходные вещества для их получения, впрочем, получают известными методами, которые описаны в литературе (например, в классических работах, как Губен-Вейл "Методы органической химии", изд. Georg-Thieme, Штутгарт), а именно при реакционных условиях, которые известны и пригодны для указанных превращений. При этом также можно использовать известные, здесь подробнее не упомянутые варианты.

Исходные вещества, если желательно, также можно получать in situ, так что их не выделяют из реакционной смеси, а тотчас вводят во взаимодействие далее до получения соединений формулы (I).

Соединения формулы (I) можно получать тем, что их высвобождают из их функциональных производных путем сольволиза, в особенности гидролиза, или путем гидрогенолиза.

Предпочтительными исходными веществами для сольволиза, соответственно, гидрогенолиза, являются такие, которые вместо одной или нескольких свободных амино- и/или гидроксильных групп содержат соответствующие защищенные амино- и/или гидроксильные группы, предпочтительно такие, которые вместо Н-атома, который связан с N-атомом, содержат защитную для амино-группы группу, например такие, которые соответствуют формуле (I), однако вместо NH-группы содержат NHR' -группу (где R' обозначает защитную для амино-группы группу, например, BOC или CBZ).

Далее, предпочтительны исходные вещества, которые вместо Н-атома гидроксильной группы содержат защитную для гидроксильной группы группу, например такие, которые соответствуют формуле (I), но вместо гидроксифенильной группы содержат R"O-фенильную группу (где R" обозначает защитную для гидроксильной группы группу).

Также в молекуле исходного вещества может быть несколько - одинаковых или разных - защищенных амино- и/или гидроксильных групп. В случае, если имеющиеся защитные группы отличны друг от друга, во многих случаях их можно селективно отщеплять.

Выражение "защитная для амино-группы группа" общеизвестно и относится к группам, которые пригодны для защиты (блокирования) аминогруппы от химических превращений, и которые, однако, легко удаляются, после того как произошла желательная химическая реакция в других местах молекулы.

Типичны для таких групп незамещенные или замещенные ацильные, арильные, аралкоксиметильные или аралкильные группы. Так как защитные группы удаляются после желательной реакции или последовательности реакции, то их род и размер, впрочем, не критические; предпочтительные, однако, группы с 1-20, в особенности с 1-8 C-атомами. Выражение "ацильная группа" в связи с настоящим способом нужно понимать в самом широком смысле. Оно охватывает производимые ацильные группы алифатических, аралифатических, ароматических или гетероциклических карбоновых или сульфоновых кислот, а также, в особенности, алкоксикарбонильные, арилоксикарбонильные и, прежде всего, аралкоксикарбонильные группы. Примерами такого рода ацильных групп являются алканоил, как ацетил, пропионил, бутирил; аралканоил, как фенилацетил; ароил, как бензоил или толуол; арилоксиалканоил; алкоксикарбонил, как метоксикарбонил; этоксикарбонил, 2,2,2-трихлорэтоксикарбонил, BOC, 2-иод-этоксикарбонил; аралкилоксикарбонил, как CBZ ("карбобензоксид"); 4-метоксибензилоксикарбонил, FMOC; арилсульфонил, как Mtr. Предпочтительными защитными для аминогруппы группами являются BOC и Mtr далее, CBZ, Fmocбензил и ацетил.

Выражение "защитная для гидроксильной группы группа" также общеизвестно и относится к группам, которые пригодны для защиты гидроксильной группы от химических взаимодействий и которые, однако, легко удаляются после того, как произошла желательная химическая реакция в других местах молекулы. Типичны для таких групп вышеуказанные незамещенные или замещенные арильные, аралкильные или ацильные группы; далее, также алкильные группы. Природа и величина защитных для гидроксильных групп групп не критические, так как их после желательной химической реакции или последовательности реакций снова удаляют; предпочтительны группы с 1-20, в особенности с 1-10 C-атомами. Примерами защитных для гидроксильной группы групп являются, между прочим, бензил, п-нитробензоил, п-толуолсульфонил, трет.-бутил и ацетил, причем особенно предпочтительны бензил и трет.-бутил, COOH-группы в аспарагиновой кислоте и глутаминовой кислоте предпочтительно защищаются в форме их сложных трет.-бутиловых эфиров (например, Asp [OBut]).

Используемые в качестве исходных веществ функциональные производные соединения формулы (I) можно получать обычными методами синтеза аминокислот и пептидов, которые описаны, например, в указанных классических работах в патентных заявках, например, также по твердофазному способу согласно Merrifield [B.F. Gysin и R.V. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 94, 3102 и последующие (1972)].

Высвобождение соединений формулы (I) из их функциональных производных осуществляется - в зависимости от используемой защитной группы, - например, с помощью сильных кислот, целесообразно с помощью ТФК или хлорной кислоты, однако также с помощью других сильных неорганических кислот, как соляная кислота или серная кислота; сильных органических карбоновых кислот, как трихлоруксусная кислота; или сульфокислот, как бензо- или п-толуол-сульфокислота. Возможно присутствие дополнительного инертного растворителя, однако не всегда требуется. В качестве инертных растворителей предпочтительно пригодны органические, например карбоновые, кислоты, как уксусная кислота; простые эфиры, как тетрагидрофуран или диоксан, амиды, как ДМФ, галогенированные углеводороды, как дихлорметан; далее, также спирты, как метанол, этанол или изопропанол, а также вода. Далее, принимают во внимание смеси вышеуказанных растворителей. ТФК применяется предпочтительно в избытке, без добавки другого растворителя; хлорная кислота используется в виде смеси из уксусной кислоты и 70 %-ной хлорной кислоты в соотношении 9:1. Температуры реакции для расщепления составляют целесообразно примерно C-НООС, предпочтительно работают при температуре 15-30°C (комнатная температура).

Группы BOC, OBut и Mtr можно отщеплять, например, предпочтительно с помощью ТФК в дихлорметане или с помощью примерно 3-5 и HCl в диоксане при 15-30°C; FMOC-группу можно отщеплять с помощью примерно 5-50 %-ного раствора диметиламина, диэтиламина или пиперидина в ДМФ при 15-30°C.

Гидрогенолитически удаляемые защитные группы (например, как CBZ или бензил) можно отщеплять, например, путем обработки водородом в присутствии катализатора (например, катализатора на основе благородного металла, как палладий, целесообразно на носителе, как уголь). В качестве растворителя при этом пригодны вышеуказанные, в особенности, например, спирты как метанол или этанол, или амиды, как ДМФ. Гидрогенолиз, как правило, осуществляют при температурах примерно 0-100°C и давлениях примерно 1-200 бар, предпочтительно при 20-30°C и 1-10 барах. Гидрогенолиз CBZ-группы хорошо протекает, нап-

пример, на 5-10 %-ном палладии-на-угле в метаноле или с помощью формиата аммония (вместо водорода) на Pd-C в смеси метанола с ДМФ при 20-30°C.

Соединения формулы (I) также можно получать путем циклизации соединений формулы (II) при условиях пептидного синтеза. При этом целесообразно работают по обычным методам синтеза пептидов, которые описаны, например в Губен-Вейль, цитировано выше, том 15/11, с. 1-806 (1974).

Реакцию предпочтительно осуществляют в присутствии дегидратирующего средства, например карбодимида, как DCC или EDCI; далее, ангидрида пропанфосфоновой кислоты (см. *Angew. Chem.* 92, 129(1980)), дифенилфосфорилазида или 2-этокси-N-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолина, в инертном растворителе, например в галогенированном углеводороде, как дихлорметан; простом эфире, как тетрагидрофуран или диоксан; амиде, как ДМФ или диметилацетамид; нитриле, как ацетонитрил; или в смесях этих растворителей; при температурах примерно от -10°C до 40°C, предпочтительно при 0-30°C. Для того чтобы способствовать внутримолекулярной циклизации перед межмолекулярным связыванием пептида, целесообразно работать в разбавленных растворах (принцип разбавления).

Вместо соединений формулы (II) также можно использовать в реакции пригодные реакционноспособные производные этих веществ, например, также в которых реакционноспособные группы промежуточно блокированы за счет защитных групп. Аминокислотные производные формулы (II) можно применять, например, в виде их активированных сложных эфиров, которые целесообразно получают *in situ*, например, благодаря добавке HOBT или N-гидроксисукцинимид.

Исходные вещества формулы (II) как правило являются новыми. Их можно получать известными способами, например вышеуказанными методами синтеза пептидов и отщепления защитных групп.

Как правило, сначала синтезируют защищенные пентапептидные сложные эфиры формулы R'-Z-OR'', например, Boc-Z-OMe или Boc-Z-OEt, которые прежде всего омыляют до кислот формулы R'-Z-OH, например, Boc-Z-OH; от них отщепляют защитную группу R', благодаря чему получают свободные пептиды формулы H-Z-OH (II).

Основание формулы (I) с помощью кислоты можно переводить в соответствующую соль присоединения кислоты. Для этого превращения принимают во внимание в особенности кислоты, которые дают физиологически приемлемые соли. Так, можно применять неорганические кислоты, например, как серная кислота; азотная кислота; галогенводородные кислоты, как соляная кислота или бромоводородная кислота, фосфорные кислоты, как ортофосфорная кислота; сульфаминовая кислота; далее, органические кислоты, в особенности алифатические, алициклические, арилатические, ароматические или гетероциклические одно- или многоосновные карбеновые, сульфоновые или серные кислоты, например, как муравьиная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота, пивалиновая кислота, диэтилуксусная кислота, малоновая кислота, янтарная кислота, пимелиновая кислота, фумаровая кислота, малеиновая кислота, молочная кислота, винная кислота, яблочная кислота, бензойная кислота, салициловая кислота, 2- или 3-фенилпропионовая кислота, лимонная кислота, глюконовая кислота, аскорбиновая кислота, никотиновая кислота, изоникотиновая кислота, метан- или этансульфонокислота, этандисульфокислота, 2-гидроксиэтансульфонокислота, бензолсульфонокислота, п-толуолсульфонокислота, нафталин-моно- и -ди-сульфонокислоты, лаурилсерная кислота. Для выделения и/или очистки соединений формулы (I) можно применять соли физиологически приемлемых кислот, например пикраты.

С другой стороны, кислоту формулы (I) путем введения во взаимодействие с основанием можно переводить в одну из ее физиологически приемлемых солей металлов или аммония. В качестве солей при этом принимают во внимание в особенности соли натрия, калия, магния, кальция и аммония; далее, замещенные аммониевые соли, например, как диметил-, диэтил- или диизопропил-аммониевые соли; моноэтанол-, диэтанол- или триэтанол-аммониевые соли; циклогексил-, дикаллогексил-аммониевые соли; дибензилэтилендиаммониевые соли; далее, например, соли с N-метил-D-глукламином или с аргинином или лизином.

Новые соединения формулы (I) и их физиологически приемлемые соли можно применять для получения фармацевтических препаратов тем, что их в эффективном количестве вместе по меньшей мере с одним носителем или вспомогательным веществом и, если желательно, вместе с одним или несколькими другими биологически активными веществами доводят до пригодной дозировочной формы. Таким образом полученные композиции можно использовать в качестве лекарственного средства в медицине или ветеринарии. В качестве носителей принимают во внимание, например, неорганические вещества, которые пригодны для энтерального (например, орального или ректального), парентерального (например, внутривенной инъекции) или локального (например, топического, а также через кожу, глаза или нос) введения или для введения в форме ингаляционных препаратов и не реагируют с новыми соединениями, например, как вода или водный изотонический раствор хлорида натрия, низшие спирты, растительные масла, бензиловые спирты, полиэтиленгликоли, триацетат целлюлозы и другие глицериды жирных кислот, желатина, соевый лецитин; углеводы, как лактоза или крахмалы, стеарат магния, тальк, целлюлоза, вазелин. Для орального применения служат в особенности таблетки, драже, капсулы, сиропы, соки или капли; специальный интерес представляют лакированные таблетки и капсулы с резистентными к желудочному соку покрытиями, соответственно оболочками капсул. Для ректального применения служат свечи; для парентерального введения служат растворы, предпочтительно масляные или водные растворы, далее, суспензии, эмульсии или имплантаты. Для топического применения пригодны, например, растворы, которые можно применять в виде глазных капель; далее, например, суспензии, эмульсии, кремы, мази или аэрозоли. Для применения в виде ингаляционных препаратов можно применять пульверизаторы, которые содержат биологически активное вещество либо растворенным, либо суспендированным в рабочем газе или смеси рабочих газов (например, CO₂ или фторхлоруглеводороды). При этом целесообразно применяют биологически ак-

тивное вещество в микронизированной форме, причем можно добавлять один или несколько дополнительных, физиологически приемлемых растворителей, например этанол. Растворы для ингаляций можно вводить с помощью обычных ингаляторов. Новые соединения можно также лиофилизировать и полученные лиофилизаты применять, например, для приготовления препаратов для инъекции. При этом инъекции можно осуществлять дозированно или в виде непрерывного вливания [например, внутривенно, внутримышечно, подкожно или внутрь ликворного пространства]. Указанные композиции могут быть стерилизованы и/или могут содержать вспомогательные вещества, как консерванты, стабилизаторы и/или смачиватели, эмульгаторы, соли для влияния на осмотическое давление, буферные вещества, красители и/или ароматизирующие вещества. Если желательно, они могут содержать также одно или несколько других биологически активных веществ, например один или несколько витаминов.

Предлагаемые, согласно изобретению вещества, как правило, можно вводить по аналогии с другими известными, имеющимися в продаже пептидами, в особенности по аналогии с описанными в патенте США № А-4 472305 соединениями, предпочтительно в дозах примерно 0,05-500, в особенности 0,5-100 мг на дозировочную единицу. Суточная доза составляет предпочтительно примерно 0,01-2 мг/кг веса тела. Специальная доза для каждого определенного пациента зависит, однако, от самых различных факторов, например от эффективности используемого соединения, возраста, веса тела, общего состояния здоровья, пола, стоимости, момента и пути введения, скорости выделения, комбинации лекарственных веществ и тяжести соответствующего заболевания, которое имеет значение для терапии. Предпочтительно парентеральное введение.

Далее, новые соединения формулы (I) можно применять в качестве интегриновых лигандов для изготовления колонок для аффинной хроматографии с целью получения чистыми интегринов.

Лиганд, т.е. пептидное производное формулы (I), при этом за счет анкерных функций ковалентно связывается с полимерным носителем.

В качестве полимерных носителей пригодны само по себе известные в химии пептидов полимерные твердые фазы предпочтительно с гидрофильными свойствами, например поперечно сшитые полисахара, как целлюлоза, сефароза или сефадекс® акриламид, полимеры на основе полиэтиленгликоля или Tentakel-полимеры®.

В качестве анкерных функций, которые связаны с полимерными носителями, пригодны предпочтительно линейные алкиленовые цепи с 2-12 С-атомами, которые одним своим концом непосредственно связаны с полимером, а на другом конце содержат функциональную группу, как, например, гидроксил, аминок, меркапто, малеинимидо или -COOH, и поэтому пригодны для связывания с С-или N-концевым отрезком соответствующего пептида.

При этом возможно, что пептид связывается с анкером полимера непосредственно или также через вторую анкерную функцию. Далее, возможно, что пептиды, которые содержат аминокислотные остатки с функционализированными боковыми цепями, через них связываются с анкерной функцией полимера.

Сверх того, определенные аминокислотные остатки, которые представляют собой составную часть пептидов формулы (I), можно модифицировать в их боковых цепях таким образом, чтобы они были доступны для связывания через, например, SH-, OH-, NH₂- или COOH-группы с анкером полимера.

При этом возможны необычные аминокислоты, как, например, производные фенилаланина, которые в 4-положении фенильного кольца содержат меркаптогидрокси-, amino- или карбоксиалкильную цепь, причем функциональная группа находится на конце цепи.

Примерами аминокислотных остатков, боковая цепь которых может служить непосредственно в качестве анкерной функции, являются, например, Lys, Orn, Arg, Dab, Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Thr, Cys, Cit или Tyr.

Примерами N-концевых анкерных остатков являются такие остатки, как, например, -CO-C_nH_{2n}-NH₂; -CO-C_nH_{2n}-OH; -CO-C_nH_{2n}-SH или -CO-C_nH_{2n}-COOH с "n"=2-12, причем длина алкиленовой цепи не критическая и в случае необходимости она может быть заменена также, например, соответствующими арильными или алкиларильными остатками.

С-концевые анкеры могут представлять собой, например, -O-C_nH_{2n}-SH; -O-C_nH_{2n}-OH; -O-C_nH_{2n}-NH₂; -O-C_nH_{2n}-COOH, -NH-C_nH_{2n}-SH; -NH-C_nH_{2n}-OH; -NH-C_nH_{2n}-NH₂ или -NH-C_nH_{2n}-COOH, причем "n", а также алкиленовая цепь имеют уже указанное в предыдущем абзаце значение.

N- и С-концевые анкеры также могут служить в качестве анкерных звеньев уже функционализированной боковой цепи аминокислотного остатка. Здесь принимают во внимание, например, аминокислотные остатки, как Lys (CO-C₅H₁₀-NH₂), Asp (NH-C₃H₆-COOH) или Cys (C₃H₆-NH₂), причем анкер всегда связан с функциональной группой боковой цепи.

Получение материалов для аффинной хроматографии для очистки интегрин осуществляют при условиях, которые сами по себе известны для конденсации аминокислот.

Температура указана в градусах Цельсия. В нижеприведенных примерах "обычная обработка" обозначает: добавляют, если необходимо, воду; нейтрализуют; экстрагируют эфиром или дихлорметаном; отделяют, сушат органическую фазу над сульфатом натрия; фильтруют; выпаривают и очищают путем хроматографии на силикагеле и/или путем кристаллизации. RZ=время удерживания (минуты) при ВЭЖХ на Lichrosorb® RP Select B (250-4,7 мкм)-колонке; растворитель: 0,3% ТФК в воде; изопропанольный градиент 0-80 объемн. % за 50 мин при скорости 1 мл/мин. Истечение и детектирование при 215 нм. M* = молекулярный пик в масс-спектре; получают согласно методу "бомбардировки быстрыми атомами" (FAB).

Пример 1.

Раствор 0,2 г H-Arg-Gly-Asp-D-Pro,-Val-ONa [например, получен из Fmoc-Arg-Gly-Asp-D-Pro-Val-O-Wang, причем -O-Wang обозначает используемый в модифицированном способе Merrifield остаток 4-оксиметил-феноксиметил-полистирольной смолы, путем отщепления Fmoc-группы с помощью пиперидина в ДМФ и отщепления смолы с помощью ТФК в CH₂Cl₂ (1:1)] в 15 мл ДМФ разбавляют с помощью 85 мл дихлорметана и смешивают с 50 мг бикарбоната натрия. После охлаждения в смеси сухого льда с ацетоном добавляют 40 мкл дифенилфосфорилазида.

После стояния в течение 16 часов при комнатной температуре раствор концентрируют. Концентрат подвергают гель-фильтрации (Сефадекс G10-колонка в смеси изопропанола с водой в соотношении 8:2) и затем очищают как обычно с помощью ВЭЖХ. Получают цикло- (Arg-Gly-Asp-D-Pro-Val); RZ = 13,4; M⁺ = 525. Аналогичным образом, путем циклизации соответствующих линейных пептидов получают

цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Tic-Val); RZ = 18,4; M⁺ 587;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val); M⁺ 575;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Lys-Val); RZ = 6,8; M⁺ 556;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys); RZ = 10,9; M⁺ 604;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Gly); RZ = 13,1; M⁺ 533;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Ala); RZ = 14,3; M⁺ 547;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Phe); RZ = 22,0; M⁺ 623;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu); RZ = 21,2; M⁺ 589;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Nal-Val); RZ = 24,7; M⁺ 625;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phg-Val); RZ = 16,5; M⁺ 561;
цикло - (Arg-Gly-Asp-Phe-Gly); RZ = 13,2; M⁺ 533;
цикло - (Arg-Gly-Asp-Phe-D-Ala); RZ = 14,8; M⁺ 547;
цикло - (Arg-Gly-Asp-Phe-D-Phe); RZ = 20,2; M⁺ 623;
цикло - (Arg-Gly-Asp-Phe-D-Leu); RZ = 21,4; M⁺ 589;
цикло - (Arg-(Mtr)-Gly-Asp-D-Phe-Lys); RZ = 23,4; M⁺ 816;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys (H₃C-CO)); RZ = 17,0; M⁺ 646;
цикло - (Arg(Mtr)-β-Ala-Asp-Phe-D-Val); RZ = 28,2; M⁺ 801;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Nle); RZ = 22,0; M⁺ 589;
цикло - (D-Arg-Gly-D-Asp-D-Phe-Val); RZ = 17,5; M⁺ 575;
цикло - (Arg-Gly-D-Asp-D-Phe-D-Gly); RZ = 18,7; M⁺ 575;
цикло - (Arg-D-Ala-Asp-D-Phe-Val); RZ = 18,9; M⁺ 589;
цикло - (Arg-D-Ala-Asp-Phe-D-Val); RZ = 19,1; M⁺ 589;
цикло - (Arg-Aha-Asp-D-Phe-Val); RZ = 20,8; M⁺ 631;
цикло - (Arg-Abu-Asp-Phe-D-Val); RZ = 17,2; M⁺ 603;
цикло - (Arg-Aha-Asp-Phe-D-Val); RZ = 19,8; M⁺ 631;
цикло - (Arg-Abu-Asp-D-Phe-Val); RZ = 17,8; M⁺ 603;
цикло - (Arg-Gly-Asp-D-(4-I-Phe)-Val); RZ = 23,3; M⁺ 701;
цикло - (Arg-Gly-Asp-Phe-Val); RZ = 21,8; M⁺ 575;
цикло - (Arg-Gly-D-Asp-D-Phe-Val); RZ = 20,7; M⁺ 575;
цикло - (D-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val); RZ = 20,8; M⁺ 575;
цикло - (D-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val); RZ = 21,9; M⁺ 575;
цикло - (Arg-Gly-D-Asp-D-Phe-Val); RZ = 20,7; M⁺ 575;

Пример 2.

Раствор 0,28 г цикло -(Arg[Mtr]-β-Ala-Asp-Phe-D-Val) [получен путем циклизации согласно примеру 1] в 8,4 мл ТФК, 1,7 мл дихлорметана и 0,9 мл тиофенола выдерживают 4 часа при комнатной температуре, затем концентрируют и после разбавления водой подвергают сушке вымораживанием. Гель-фильтрация на Сефадексе G10 (уксусная кислота/вода 1:1) и последующая очистка путем препаративной ВЭЖХ в указанных условиях дают цикло-(Arg-β-Ala-Asp-Phe-D-Val); RZ = 17,0; M⁺ 589.

Аналогичным образом получают:

Из

цикло-(Arg(Mtr)-Gly-Asp-D-Phe-Lys):
цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys); RZ = 10,9; M⁺ 604

из

цикло-(D-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-D-Phe-Val):
цикло-(D-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val);

из

цикло-(Arg(Mtr)-Gly-D-Asp(OEt)-D-Phe-Val):
цикло-(Arg-Gly-D-Asp-D-Phe-Val);

из

цикло-(Arg(Mtr)-Gly-Asp-Phe-D-Nal):
цикло-(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Nal);

из

цикло-(Arg(Mtr)-Gly-Asp-Phe-D-Leu):
цикло-(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Leu);

из

цикло-(Arg(Mtr)-Gly-Asp-Phe-D-Ser):
цикло-(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Ser);

из
цикло -(Arg(Mtr)-Gly-Asp-D-Nal-Leu):
цикло -(Arg-Gly-Asp-D-Nal-Leu);
из
цикло-(Arg(Mtr)-Gly-Asp-Nal-D-Val):
цикло -(Arg-Gly-Asp-Nal-D-Val);
из
цикло -(Arg(Mtr)-Gly-Asp-Phg-D-Val):
цикло -(Arg-Gly-Asp-Phg-D-Val);
из
цикло -Arg(Mtr)-Gly-Asp-Trp-D-Val):
цикло -(Arg-Gly-Asp-Trp-D-Val).

Пример 3.

80 мг цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu) растворяют 5-6 раз в 0,01 М HCl и после каждого процесса растворения подвергают сушке вымораживанием. Последующая очистка с помощью ВЭЖХ дает цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu)·HCl; RZ = =20,6; M⁺ 589.

Аналогичным образом получают из цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val): цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)·HCl; RZ = 18,4; M⁺ 575;

из цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu) : цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu)·HCl;

из цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu) путем обработки уксусной кислотой;

цикло - (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu) • H₃C-COOH; RZ = 19,2; M⁺ 589,

из цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu) путем обработки азотной кислотой,

цикло -(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu) - HNO₃; RZ = =20,4; M⁺ 589.

Пример 4.

Для приготовления аффинных фаз 0,9 г N-малеинимида-(CH₂)₅-CO-NH-(CH₂)₃-полимера [получен путем конденсации N-малеинимида-(CH₂)₃, -COOH с H₂N-(CH₂)₃-полимером] суспендируют в 10 мл 0,1 М натрий фосфатного буфера при pH = 7 и при 4°С добавляют 1 эквивалент цикло-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys (CO(CH₂)₂SH)]. Перемешивают в течение 4-х часов при одновременном нагревании реакционной смеси до комнатной температуры, отфильтровывают твердый остаток и промывают дважды по 10 мл буферным раствором (pH=7) и затем трижды по 10 мл водой. Получают цикло-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys-/CO/CH₂/2S-3-(N-малеини-мидо-(CH₂)₅-CONH(CH₂)₃-полимер)].

Пример 5.

Аналогично примеру 1, путем конденсации полимер-O-(CH₂)₃-NH₂-(выпускается в продажу) с цикло-(Arg-Gly-Asp-D-Pro-Lys(CO)CH₂)₄-COOH) получается путем конденсации алипиновой кислоты с цикло-[Arg-Gly-Asp-D-Pro-Lys] при указанных условиях] получают следующую полимерную фазу: цикло-[Arg-Gly-Asp-D-Pro-Lys-/CO/CH₂/4-CO-NH-/CH₂/3-O-полимер].

Аналогичным образом, путем конденсации цикло-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys-/CO-/CH₂/5 -NH₂] с HOOC-CH₂-O-полимером получают цикло-[Arg-Gly--Asp-D-Phe-Lys-/CO/CH₂/5-NH-CO-CH₂-O-полимер].

Нижеприведенные примеры относятся к фармацевтическим композициям:

Пример А.

Стеклянные пузырьки с препаратом для инъекции

В растворе из 100 г циклопептида формулы (I) и 5 г динатрийгидрофосфата в 3 л бидистиллированной воды с помощью 2 н. соляной кислоты устанавливают pH=6,5, стерильно фильтруют, разливают в стеклянные пузырьки для препаратов для инъекции, лиофилизируют в стерильных условиях и стерильно закрывают. Каждый пузырек с препаратом для инъекции содержит 5 мг биологически активного вещества.

Пример Б.

Свечи

Смесь 20 г биологически активного вещества формулы (I) со 100 г соевого лецитина и 1400 г масла какао расплавляют, выливают в формы и оставляют охлаждаться. Каждая свеча содержит 20 мг биологически активного вещества.

Пример В.

Раствор

Готовят раствор из 1 г биологически активного вещества формулы 1, 9, 38 г NaH₂PO₄·2H₂O, 28,48 г Na₂HPO₄·12H₂O и 0,1 г бензальконийхлорида в 940 мл бидистиллированной воды. Устанавливают pH = 6,8, доливают до 1 л и стерилизуют путем облучения. Этот раствор применяют в форме глазных капель.

Пример Г.

Мазь

Смешивают 500 мг биологически активного вещества формулы I с 99,5 г вазелина в асептических условиях.

Пример Д.

Таблетки

Смесь 100 г циклопептида формулы (I), 1 кг лактозы, 600 г микрокристаллической целлюлозы, 600 г кукурузного крахмала, 100 г поливинилпирролидона, 80 г талька и 10 г стеарата магния обычным образом прессуют в таблетки так, чтобы каждая таблетка содержала 10 мг биологически активного вещества.

Пример Е.

Драже

Прессуют таблетки, как указано в примере Д, и затем их покрывают обычным образом покрытием из сахарозы, кукурузного крахмала, талька, траганта и красителя.

Пример Ж.

Капсулы

Обычным образом твердые желатиновые капсулы заполняют биологически активным веществом формулы (I) так, чтобы каждая капсула содержала 5 мг биологически активного вещества.

Пример З.

Ингаляционный пульверизатор

14 г биологически активного вещества формулы (I) растворяют в 10 л изотонического раствора NaCl и раствор заливают в продажные сосуды для распыления с помощью насоса. Раствор можно распылять в рот или в нос. Один впрыск (примерно 0,1 мл) соответствует дозе примерно 0,14 мг.

Результаты фармакологических испытаний представлены далее.

Способ: 1 мг мл⁻¹ биотин-лиганды были инкубированы с 1 мг мл⁻¹ выделенных рецепторов в присутствии многократно разведенного раствора EMD пептидов. После 3 часов выдерживания при температуре 30°C связанные лиганды измеряли с помощью детектора анти-биотин-алкалин-фосфатазы.

Результаты фармакологических тестов.

IC₅₀ для связывания биотинилированных лигандов с человеческими плацентальными avβ3 и плателальными allb β3.

Соединение, №	M ⁺ +1 (FAB)/RT[Min] (HPLC)	Последовательность	Пример	Фармакол. данные	
				IC ₅₀ [nMol/l]; VN: allbβ3	IC ₅₀ [nMol/l] FGN:avβ
65493	525/13.4	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPro-Val)	1	575	>1000
65494	587/18.4	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTic-Val)	1	125	>1000
66203	575/—	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Val) x HCl	1,3	4,87	>1000
66541	556/6.8	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DLys-Val)	1	135	
66542	604/10.9	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys)	1,2	4,20	>1000
6543	533/13.1	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Gly)	1	8,10	>1000
66544	547/14.3	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Ala)	1	9,70	800
66545	623/22.0	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Phe)	1	10,75	>1000
66546	589/21.2	Cyclo-(Arg-Gly-A5p-DPhe-Leu)	1	6,80	
67301	625/24.7	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DNal-Val)	1	4,00	>1000
67302	561/16.5	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhg-Val)	1	1,70	90
67303	533/13.2	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Phe-Gly)	1	15,00	125
67304	547/14.8	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Phe-DAla)	1	49,00	375
67305	623/20.2	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Phe-DPhe)	1	227	750
67306	589/21.4	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Phe-DLeu)	1	18,00	345
67675	801/28.2	Cyclo-(Arg(Mtr)-OAla-Asp-Phe-DVal)	1	261	>1000
67711	589/22.0	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Nle)	1	12,80	>1000
68222	589/19.2	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Leu) x Ac	3	8,90	>1000
68274	589/20.4	Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Leu) x	3	7,10	>1000

(VN = Витронектин; FGN = Фибриноген) .

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
(03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03
