

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

207 103 B

(21) A bejelentés száma: 6270/90
(22) A bejelentés napja: 1990. 09. 28.
(30) Elsőbbségi adatok:
416 336 1989. 10. 03. US

(51) Int. Cl.⁵

C 07 K 7/06
A 61 K 37/02

(40) A közzététel napja: 1991. 06. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1993. 03. 01. SZKV 93/03

(72) Feltaláló:

Krstenansky, John Leonard, Cincinnati, Ohio (US)

(73) Szabadalmas:

Merrell Dow Pharmaceuticals Inc., Cincinnati,
Ohio (US)

(54)

Eljárás véralvadásgátló peptidek és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás $X-A_2-A_3-A_4-A_5-A_7-A_8-A_9-A-Y$ (1) általános képletű peptidek és sóik előállítására.

Az (1) általános képletben

X jelentése amino-végcsoport, amely lehet hidrogén-atom, kétértékű 2–8 szénatomoszámu alkanoil-, benziloxi karbonil- vagy t-butoxi-karbonilcsoport;
 A_1 jelentése Gly-Asp, Tyr-Pro-Ile-Pro, Tyr-Glu-Pro-Tiq, Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro, Tyr-Glu-Ile-Pro, Npa-Pro-Ile Pro, Tyr-Glu-Pro-Pro, Tyr-Glu-Pro-Ile, Phe-Glu-Pro-Ile-Pro, vagy Glu-Pro-Ile-Pro;

A_2 jelentése Phe, SubPhe, pChloroPhe, D-Phe, NMePhe vagy egy kötés;

A_3 jelentése Glu vagy Asp

A_4 jelentése Glu, Asp, Ala vagy egy kötés;

A_5 jelentése Ile, Val, Leu, Nle, Ala, D-Leu vagy egy kötés;

A_7 jelentése Glu, Asp vagy egy kötés;

A_8 jelentése Glu, Asp vagy egy kötés;

A_9 jelentése Tyr, I-Tyr, D-Tyr, Cha vagy egy kötés;

A_{10} jelentése Asp, D-Asp, Asn, Glu, D-Glu vagy Gln;

Y jelentése hidroxil- vagy aminocsoport.

A találmány szerinti eljárással előállított peptidek véralvadásgátló hatásúak.

A találmány tárgya eljárás új (1) általános képletű vér-alvadásgátló hatású peptidek, valamint ezeket a peptideket hatóanyagként tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására.

A vér-alvadásgátló szerek fontos gyógyszerészeti hatóanyagok például akut mélyvénás thrombosis, tüdőembólia, akut végtag artéria embólia, szívizom infarktus, és eloszlott éredényen belüli koaguláció kezelésére. A vér-alvadásgátlók megelőző alkalmazása megelőzi az embólia kialakulását olyan betegekben, akik reumás, vagy érelmeszesedéses szívbetegségben szenvednek, és megelőz bizonyos thrombo-embóliás komplikációkat operációk során. A vér-alvadásgátlók alkalmazása ugyancsak alkalmas artéria és agyér betegségek kezelésére. Az artéria thrombosis különösen a szívizmot és az agyat ellátó artériákban halálhoz vezet.

A 65 aminosav egységből álló hirudin polipeptidet pióca nyálmirigyéből izolálták [Markwardt, F. and Walsmann, P. (1976), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1381-1386 (1976)]. A peptid teljes aminosav szekvenciáját Dodl, J. et al. FEBS Lett 165, 180-183 (1984) ismertette. Továbbá azt is leírták, hogy a hirudin C-terminális részén kell lenni a fontos kötődési helyeknek [Chang, J. FEBS Lett. 164, 307 (1983)].

A Hirudin thrombin specifikus inhibitor és ennélfogva alkalmazható vér-alvadásgátló szerként. Klinikai alkalmazása azonban nehézségekbe ütközik, mivel piócaiból extrahálva nem elég nagy mennyiségben áll rendelkezésre, valamint költséges az előállítása, és sok esetben ilyen nagyméretű fehérjék adagolása esetében a szervezetben allergiás reakciók fejlődnek ki.

Vizsgálataink kezdetén felfedeztük a hirudin egy specifikus fragmensét, amely – legalább részben – hordozza a vér-alvadásgátló tulajdonságot. Ezt a peptid fragmenst (amely az 55-65 aminosav egységek közötti peptid fragmens a hirudinban) kémiai szintetizáltuk és kimutattuk hogy a thrombin felismerési receptorhoz kötődik, a kötődési receptor egység térbelileg jelentősen eltér az enzim hasítási helytől. Kimutatható, hogy a szintetikus peptidek kötődése versengően megakadályozza a thrombin felismerési receptorhoz való fibrinogén kötődését, amely alapvető feltétele a fibrin képződésnek és a vérrög kialakulásnak, ennélfogva ezek potenciális vér-alvadásgátlókként alkalmazhatók.

A későbbiek során előállítottuk a fentiekben említett peptid-származékokat az eredeti szekvenciából egyes aminosavak elhagyásával. Részletesebben a különböző aminosavak elhagyásával létrejött sorozat alkalmas arra, hogy meghatározza a peptid tulajdonságainak szekvencia függését helyzetileg és összetételben is, és az alapját képezi a hatóanyag tervezésnek. Sok ilyen peptid analóg az alap peptid jellemzőivel rendelkezik és ennélfogva tudományosan, valamint terápiásan hasznos vér-alvadásgátlásban alkalmazható vegyület. Ezen túlmenően az aminosav analógok önmagukban olyan javított jellemzőt hordozhatnak, ami a hatás megnövelt ideig való kifejtését biztosítja.

A találmány tárgya eljárás az $X-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-A_7-A_8-A_9-A_{10}-Y$ (1) általános képletű peptidek előállítására, ahol az általános képletben

X jelentése amino-végcsoport, amely lehet hidrogénatom, kétértékű 2-8 szénatomoszámmú alkanoil-, benziloxi karbonil- vagy t-butoxi-karbonicsoport;
 A_1 jelentése Gly-Asp, Tyr-Pro-Ile-Pro, Tyr-Glu-Pro-Tiq, Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro, Tyr-Glu-Ile-Pro, Npa-Pro-Ile Pro, Tyr-Glu-Pro-Pro, Tyr-Glu-Pro-Ile, Phe-Glu-Pro-Ile-Pro vagy Glu-Pro-Ile-Pro;
 A_2 jelentése Phe, SubPhe, pChloroPhe, D-Phe, NMe-Phe vagy egy kötés;
 A_3 jelentése Glu vagy Asp;
 A_4 jelentése Glu, Asp, Ala vagy egy kötés;
 A_5 jelentése Ile, Val, Leu, Nle, Ala, D-Leu vagy egy kötés;
 A_7 jelentése Glu, Asp vagy egy kötés;
 A_8 jelentése Glu, Asp vagy egy kötés;
 A_9 jelentése Tyr, I-Tyr, D-Tyr, Cha vagy egy kötés;
 A_{10} jelentése Asp, D-Asp, Asn, Glu, D-Glu vagy Gln;
Y jelentése hidroxil- vagy aminocsoport.

Az alábbiakban rövidítések értelmezését adjuk meg:
(1) aminosavak és betű rövidítések; (2) módosított és szokatlan aminosavak; (3) terminális aminocsoport és karboxilcsoport szubsztituensek, amelyeket a leírás során alkalmazunk;

25	(1) Aminosavak és hárombetűs jelölésük	
	L-aminosavak	D-aminosavak
	Ala – (vagy A) alanin	
	Arg – (vagy R) arginin	
30	Asn – (vagy N) szaparin	
	Asp – (vagy D) aszparaginsav	D-Asp (vagy d)- D-aszparaginsav
	Cys – (vagy C) cisztein	
	Gly – (vagy G) glicin	
35	Glu – (vagy E) glutaminsav	D-Glu (vagy e)- D-glutaminsav
	Val – (vagy V) valin	
	Gln – (vagy Q) glutamin	
	Ile – (vagy I) izoleucin	
40	Leu – (vagy L) leucin	D-Leu (vagy l)- D-leucin
	Lys – (vagy K) lizin	
	Phe – (vagy F) fenil-alanin	D-Phe (vagy f)- D-fenil-alanin
45	Met – (vagy M) metionin	
	Pro – (vagy P) prolin	
	Ser – (vagy S) szerin	
	Thr – (vagy T) treonin	
50	Tyr – (vagy Y) tirozin	D-Tyr (vagy y)- D-tirozin
	(2) Módosított és szokatlan aminosavak	
	pClPhe – p-klór-fenil-alanin	
55	Cha – ciklohexil-alanin	
	NMePhe – N-metil-fenil-alanin	
	Npa – béta-naftil-alanin	
	SubPhe – o-, m- vagy p- mono, di-szubsztituált fenil-alanin	
60	Tiq – tetrahydro-izokinolin-3-karboxilát	

Aminocsoport és karboxilcsoport terminális szubsztituensek

Ac – acetil-csoport,
Azt – azetidin-2-karboxilát-csoport,
Cin – cinnamoil-csoport,
DhCin – 3,4-dihidro-cinnamoil-csoport,
Glt – glutaril-csoport,
Mal – maleil-csoport,
Oac – 8-amino-oktánsav

Oct – oktil-csoport

Suc – szukcinil-csoport,

Glt – glutaril-csoport,

Tfa – trifluor-acetil-csoport,

– C-terminális-amid-csoport.

Az alábbiakban bemutatjuk az ismert, természetesen előforduló hirudin aminosav szekvenciát.

A hirudin aminosav szekvencia:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Val	Val	Tyr	Thr	Asp	Cys	Thr	Glu	Ser	Gly	Gln	Asn	Leu	Cys
Ile	Thr												
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Leu	Cys	Glu	Gly	Ser	Asn	Val	Cys	Gly	Gln	Gly	Asn	Lys	Cys
									Lys				
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Ile	Leu	Gly	Ser	Asp	Gly	Glu	Lys	Asn	Gln	Cys	Val	Thr	Gly
				Asn		Lys	Gly						
				Gln			Asp						
43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
Glu	Gly	Thr	Pro	Lys	Pro	Glx	Ser	His	Asn	Asp	Gly	Asp	Phe
				Asn		Glu							
57	58	59	60	61	62	63	64	65					
Glu	Glu	Ile	Pro	Glu	Glu	Tyr	Leu	Gln					
	Pro				Asp		Asp	Glu					

(Ala⁶³ Tyr⁶⁴ Leu/Asp⁶⁴ Glu⁶⁵)

A természetben előforduló aminosavak a glicin kivételével szimmetrikus királis szénatomot tartalmaznak. Amennyiben másképp nem jelöljük, a leírásban közölt optikailag aktív aminosavak L-konfigurációjúak. Például A₁ vagy A₁₀ csoport lehet D- vagy L-konfigurációjú. A szokásos szakirodalmi leírásnak megfelelően a peptideket úgy ábrázoljuk, hogy amino-terminális csoportjuk a bal oldalon és karboxil-terminális csoportjuk a jobb oldalon található.

Az (1) általános képletű polipeptidek nemtoxikus szervesen, vagy szerves savakkal gyógyszerészetiileg elfogadható sókat képeznek. Ilyen alkalmas szerves savak például a sósav, a hidrogénbromid, a kénsav és a foszforsav, valamint a sav fémsók, mint például nátriumhidrogénortofoszfát és káliumhidrogénszulfát. Alkalmazható szerves savak például a mono- di vagy tri-karbonsavak. Ilyen savak például az ecetsav, a glikolsav, a tejsav, a piruvinsav, a malonsav, a borostyánkősav, a glutánsav, a fumársav, az almasav, a borkősav, a citromsav, az aszkorbinsav, a maleinsav, a hidroximaleinsav, a benzoésav, a hidroxibenzoésav, a fenil-ecetsav, a fahéjsav, a szalicilsav, a 2-fenoxibenzoésav, és a szulfonsavak, mint például a metánszulfonsav, és a 2-hidroxi-etánszulfonsav. A karboxil-ter-

minális csoport karbonsav sói lehetnek bármely nemtoxikus karbonsav sók, amelyeket szervesen, vagy szerves bázisokkal képezünk. Ilyen sók lehetnek például alkálifém sók, például nátriumsó, káliumsó, alkáliföldfém sók, például kalciumsó, magnéziumsó; (IIIA) csoporthoz tartozó könnyűfém sók, például alumíniumsó; szerves elsőrendű, másodrendű és harmadrendű aminokkal képzett sók, például trialkil-aminnal, például trietilaminnal, prokainnal, dibenzil-aminnal, 1-etilaminnal, N,N'-dibenzil-etiléndiaminnal, dihidro-abi-etilaminnal, N-kis szénatomoszámu alkil-piperidinnel és más alkalmas aminokkal képzett sók.

Előállítási eljárás:

A találmány szerinti peptidek számos, a szakirodalomban jártas szakember által ismert eljárással előállíthatók. Ilyen eljárások lehetnek oldat fázisú peptid szintézis, szilárd fázisú sorrendi és blokk szintézis, gén klónozás és ezek kombinációja. A szilárd fázisú eljárást, amely szekvenciális megoldású, kidolgozott automatizált eljárásokkal végezhetjük és például automata peptid szintetizátort alkalmazhatunk. Az eljárásban a gyantán kötött peptidet C-terminális aminocsoporton védett aminosav csoportja révén kötjük a gyantához. Az alkalmazott gyanta hordozó lehet

bármely szokásosan a szilárd fázisú polipeptid előállításban alkalmazott gyanta, előnyösen lehet polisztirol gyanta, amelyet körülbelül 0,5–3 százalék divinil-benzol-hálósítással látunk el. A gyanta vagy klór metilezett, vagy hidroximetilezett származék, amely biztosítja a kezdetben kötött védett alfa-aminosavval való reagáltathatóságát. A C-terminális amidok esetében dimetil-benzhidril-amin-gyantát alkalmazhatunk. Miután a peptid szekvencia kapcsolását befejeztük, vagy a bal oldali Boc védőcsoportot eltávolítjuk, vagy a helyen hagyjuk vagy eltávolítjuk és az N-terminális aminocsoportot acilezzük. A védett fragmens gyantáról történő lehasítását a megfelelő amino-alkohol segítségével végezhetjük.

Például hidroximetil-gyantát írt le Bodanszky és munkatársai a Chem. Ind (London) 38, 1597–98 (1966) közleményben. Klórmetil-gyanta a kereskedelemben kapható Bio Rad Laboratories, Richmond, California terméke. Az ilyen gyanta előállítási eljárását Stewart és munkatársai „Solid Phase Peptide Synthesis” (Freeman and Co., San Francisco, 1969) közleményükben leírták (1. fejezet, 1–6 old.) A védett aminosavat a gyantához Ginsin, Helv. Chem. Acta, 56, 1476 (1973) közleménye szerinti eljárással kapcsolhatjuk. Számos gyantához kötött aminosav kereskedelemben kapható. Például egy olyan esetben, amikor a karboxi-terminális végcsoport yMeGlu, egy t-butoxi-karbonil-csoporttal (Boc) védett yMeGlu egységet kapcsolunk a benzilezett, hidroximetilezett fenil-acetamido-metil (PAM) gyantához.

Miután az aminocsoporton védett aminosavat a gyantához kapcsoltuk, a védőcsoportot bármely alkalmas eljárással, például trifluor-ecetsav diklórmétánban történő alkalmazásával, vagy trifluorecetsav önmagában történő alkalmazásával, vagy sósavas dioxánnal eltávolítjuk. A védőcsoport eltávolítását körülbelül 0 °C–szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten hajtjuk végre. Más standard specifikus alfa-aminocsoport védőcsoport eltávolítási eljárásokat is alkalmazhatunk. Miután az alfa-aminocsoport védőcsoportot eltávolítottuk, más aminocsoporton védett aminocsoportok kapcsolását végezhetjük lépésenként a kívánt sorrendben. Más esetben több aminosavból álló blokk kapcsolása is elvégezhető, amely blokkot előzetesen oldatban kapcsolunk össze.

Az egyes polipeptid szekvenciába beépített aminosavakban alkalmazott alfa-aminocsoport védőcsoport lehet bármely a szakirodalomban ismert ilyen védőcsoport. Ilyen alfa-amino-csoport védőcsoportok lehetnek (1) aciltípusú védőcsoportok, mint például formil-csoport, trifluor-acetil-csoport, ftalil-csoport, toluolszulfonil-csoport (tozil-csoport), benzolszulfonil-csoport, nitro-fenil-szulfenil-csoport, tritil-szulfenil-csoport, o-nitro-fenoxi-acetil-csoport és alfa-klór-butiril-csoport; (2) aromás karbamid típusú védőcsoportok, mint például benziloxi-karbonil-csoport, és szubsztituált benziloxi-karbonil-csoport, mint például p-klór-benziloxi-karbonil-csoport, p-nitro-benziloxi-karbonil-csoport, p-bróm-benziloxi-karbonil-csoport, p-metoxi-benziloxi-karbonil-csoport, 1-(p-bifenil)-1-metil-etoxi-karbonil-csoport, alfa, alfa-dimetil-3,5-dimetoxi-

benziloxi-karbonil-csoport, és benzdihidriloxi-karbonil-csoport; (3) alifás karbamid típusú védőcsoport, mint például t-butoxi-karbonil-csoport (Boc), diizopropil-metoxi-karbonil-csoport, izopropiloxi-karbonil-csoport, etoxi-karbonil-csoport, és alliloxi-karbonil-csoport; (4) cikloalkil-karbamid típusú védőcsoport, mint például ciklopentiloxi-karbonil-csoport, adamantiloxi-karbonil-csoport, és ciklohexiloxi-karbonil-csoport; (5) tiokarbamid típusú védőcsoport, mint például, feniltio-karbonil-csoport; (6) alakil típusú védőcsoport, mint például trifenil-metil-csoport (tritil-csoport) vagy benzil-csoport. Előnyösen alkalmazható alfa-aminocsoport védőcsoport a t-butoxi-karbonil-csoport.

Mint a szilárd fázisú peptid szintézis szakirodalmából ismert, számos aminosav olyan funkciós csoportokkal rendelkezik, amelyek a láncképzés reakciói során védőcsoportok bevezetését igénylik. A megfelelő védőcsoportok kiválasztása a szakember számára nyilvánvaló és függ attól, hogy milyen szekvenciát kívánunk előállítani, valamint, hogy milyen más védett aminosavak találhatók a peptidben. A védőcsoportok megválasztása döntő befolyású amiatt, hogy ezeknek az oldalláncokon lévő védőcsoportoknak nem szabad lehasadniuk, amikor az alfa-aminocsoport védőcsoportot eltávolítjuk. Például alkalmas oldallánc védőcsoport lizin esetében a benziloxi-karbonil-csoport és a szubsztituált benziloxi-karbonil-csoport, ahol a szubsztituens lehet halogénatom (például klóratom, brómatom, fluoratom), és nitrocsoport (például 2-klór-benziloxi-karbonil-csoport, p-nitro-benziloxi-karbonil-csoport, 3,4-diklór-benziloxi-karbonil-csoport), tozil-csoport, t-amiloxi-karbonil-csoport, t-butoxi-karbonil-csoport és diizopropil-metil-karbonil-csoport. A treonin és szerin alkoholos hidroxilcsoportja esetében alkalmazható védőcsoport lehet acetil-csoport, benzoil-csoport, t-butil-csoport, tritil-csoport, benzil-csoport, 2,6-diklór-benzil-csoport, vagy benziloxi-karbonil-csoport. Előnyösen alkalmazható védőcsoport a benzil-csoport.

A megfelelő kapcsoló reagens kiválasztása a szakember előtt világos. Különösen alkalmas kapcsoló reagens, amennyiben Gln, Asn vagy Arg aminosavat kapcsolunk a N,N'-diizopropil-karbodiimid és az 1-hidroxi-benzotriazol. A reagens alkalmazása megakadályozza a nitril és a laktám képződést. Más alkalmazható kapcsoló reagens (1) a karbodiimidek (például N,N'-diciklohexil-karbodiimid, és az N-etil-N'-(gamma-dimetil-amino-propil)-karbodiimid); (2) a ciánamidok (például az N,N'-dibenzil-ciánamid); (3) a keténimidek; (4) az izoxazolínium sók (például a N-etil-5-fenil-izoxalínium-3'-sulfonát); (5) a monociklusos nitrogéntartalmú aromás jellegű heterociklusos amidok, amelyek a gyűrűben 1–4 nitrogénatomot tartalmaznak (mint például imidazolid, pirazolid és 1,2,4-triazolid). Specifikusan alkalmazható heterociklusos amidok például az N,N'-karbonil-diimidazol, és az N,N'-karbonil-si-1,2,4-triazol; (6) alkoxilezett acetilének (például etoxi-acetilén); (7) az aminosav karboxilcsoportjával vegyes anhidridet ké-

pező reagensek (például etil-klór-formiát, és izobutil-klór-formiát), vagy a kapcsolásba viendő aminosav szimmetrikus anhidridjei (például Boc-Ala-O-Ala-Boc), (8) a gyűrű nitrogénatomján hidroxilcsoportot tartalmazó nitrogéntartalmú heterociklusos vegyületek (például N-hidroxi-ftálimid, N-hidroxi-szukcinimid, és 1-hidroxi-benzo-triazol), és (9) Castro-reagens (BOP). Más aktiválás szereket és alkalmazásukat írta le Kapoor J. Pharm. Sci., 59, 1–27 (1970) közleményében. A feltalálók előnyösnek találják a szimmetrikus anhidrid alkalmazását valamennyi aminosav esetében, kivéve az Arg, Asn és Gln aminosavakat.

Valamennyi védett aminosavat, vagy védett aminosav szekvenciát körülbelül négyszeres felesleg mennyiségben vezetünk be a szilárd fázisú reaktorba és a kapcsolást dimetil-formamid–diklórmétán (1:1) oldószerkeletben, vagy dimetil-formamidban, vagy előnyösen diklórmétánban hajtjuk végre. Amennyiben nem teljes kapcsolás történik, a kapcsolási reakciót a védőcsoport eltávolítása előtt megismételjük a következő aminosav kapcsoló reaktorba való bevezetése előtt. A kapcsolási reakció sikerességét a szintézis minden egyes lépésében E. Kaiser Analyt. Biochem. 34, 595 (1970) közleményében leírt eljárással ellenőrizhetjük.

Az alfa-aminocsoporton védett aminosav gyanta hordozóra való kapcsolása után a védőcsoportot bármely alkalmas eljárással, mint például trifluor-ecetsav diklórmétánban történő alkalmazásával, trifluor-ecetsav egyedüli alkalmazásával, vagy sósavasdioxán alkalmazásával eltávolítjuk. A védőcsoport eltávolítását körülbelül 0 °C–szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten végezzük. Más specifikus alfa-aminocsoport védőcsoportok eltávolítására alkalmas eljárást is alkalmazhatunk. Mivel az alfa-aminocsoport védőcsoportot eltávolítottuk, a kívánt sorrendben más aminocsoporton védett aminocsoportot kapcsolhatunk. Más esetben több aminosav egységet kapcsolhatunk oldószerben végzett eljárással és ezt kapcsolhatjuk a gyantára felviitt szekvenciához.

Mivel a kívánt aminosav szekvenciát előállítottuk, a peptidet a gyantáról lehasítjuk és védőcsoportjait eltávolítjuk. Ezt a reakciót hidrolízissel, mint például a gyanta-polipeptid termék vízmentes folyékony hidrogénfluoriddal savkötőszer (például anizol) jelenlétében végzett reagáltatásával végezhetjük. Jellemzően a védőcsoport eltávolítást azután végezzük, miután a peptid lánc szintézise befejeződött, de a védőcsoportok bármely alkalmas ponton is eltávolíthatók.

A védőcsoport mentesített peptid tisztítása és analízise számos ismert eljárással végezhető. A megfelelő tisztítási és analitikai eljárásokat a szakember könnyen kiválaszthatja. Alkalmas tisztítási eljárás a preparatív nagynyomású folyadék kromatográfia. A tisztított peptid analízisét analitikai nagynyomású folyadék kromatográfia, aminosav analízis, gyors atom bombázásos tömegspektroszkópia, és más alkalmas módszerek segítségével végezhetjük.

Terápiás alkalmazás:

A találmány szerinti peptid származék terápiásan hatásos dózisa 0,2 mg/kg testtömeg/nap – 250 mg/kg testtömeg/nap érték – attól függően, hogy a kezelendő beteg betegsége milyen és milyen állapotú. Az alkalmas hatásos dózis könnyen megállapítható. Előnyösen 1–4 napi dózist adagolunk, amely jellemzően 5 mg–100 mg aktív hatóanyagot tartalmaz dózisonként.

A találmány szerinti eljárással előállított peptid mennyisége, mely meggátolja a véralvadást testen kívüli közegben, például miközben a vért tárolják, a szakember által könnyen meghatározható.

A véralvadást gátló terápia számos trombózisos megbetegedés kezelésére alkalmas. Például alkalmas szívkoronária trombózis, agytrombózis kezelésére. A szakember felismeri, hogy melyek azok a körülmények, amikor véralvadást gátló terápia alkalmazása szükséges. A „beteg” elnevezés alatt főemlősöket, az embert is beleértve, valamint az emlősöket mint birkát, lovat, marhát, disznót, kutyát, macskát, patkányt és egeret értünk. A véralvadást gátló terápia nemcsak a trombózisos betegek kezelésére alkalmas, hanem minden esetben alkalmazható, amikor a vér koagulálása nemkívánatos. Például alkalmazható tárolt teljes vér esetében, valamint analitikai vizsgálatra vett tárolt vérminták esetében is.

Habár bizonyos peptid származékok túlélnek a nyelőcsőön való áthaladást orális adagolás esetében is, a feltalálók előnyösnek találják a nem orális adagolás alkalmazását. Például alkalmazható beültetett injekció forma; beültetett preparátum forma; vagy nyálkahártyán keresztül adagolt forma, mint például orr, torok vagy hörgő adagolási forma, például aeroszol forma, amely a találmány szerinti peptid származékot száraz por formában tartalmazza.

A parenterális adagolás esetében a találmány szerinti vegyületek adagolhatók injektálható formált oldat vagy szuszpenzió formában. Ebben az esetben a hatóanyagot gyógyszerészetiileg elfogadható hordozóanyaggal, mint például steril folyadékkal, például vízzel és olajokkal, amelyek ilyen készítményben alkalmazhatók, például állati, növényi vagy szintetikus eredetű olajjal, például mogoróolajjal, szójaolajjal, és ásványi olajjal, petrolátummal elegyítve formáljuk. Általában víz, fiziológiás sóoldat, vizes dextróz oldat és hasonló cukor oldat, etanol és glikol, mint például propilén-glikol vagy polietilén-glikol oldat alkalmazható előnyös hordozó anyagként az adott injektálható formált alakokban.

A találmány szerinti vegyületek adagolhatók beültetett injekció vagy preparátum formában, amelyet olyan módon állítunk elő, hogy lehetővé tegye a hatóanyag késleltetett, lassú kibocsátását. Az aktív hatóanyag labdacokká préselhető, vagy kis hengeres formára préselhető és szubkután, vagy intramuszkulárisan a szervezetbe ültethető, mint beültetett formált alak. A beültetett anyagokban különféle hordozóanyagokat, mint például biológiailag lebontható polimereket, vagy szintetikus szilikonokat például Silastic szilikongumit alkalmazhatunk, ami utóbbi a Dow–Corning Corp. terméke.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példákban részletesen bemutatjuk.

1. példa

A peptidet szilárd fázisú eljárással állítjuk elő, amelyben 8,3 mmól 0,56 mmól/g Boc D-Glu(Bzl) Merrified gyantát alkalmazunk Vega félautomata peptid szintetizátorban. Az egyes szimmetrikus anhidrid kapcsolásokat 18,3 mmól N^{alf}-Boc-aminosavakkal (Peptides International) hajtjuk végre, kivéve a Boc-Cha kapcsolást, amely két kapcsolási reakciót igényelt ahhoz, hogy negatív Kaiser-féle tesztvizsgálati eredményt szolgáltatasson. A peptid gyanta aliquot részeit (0,7–1,5 g) a 3–8. lépések során különválasztva tároljuk, a des-Glu⁵⁷ számára 1,36 g (0,50 mmól) Boc-Pro-Ile-Pro-Glu(Bzl)-Gly(Bzl)-Ala-Cha-D-Gly(Bzl)-Merri field gyanta mintát teszünk félre, a 8. ciklus után. A védett peptid fragmenset Biosystems reakcióedénybe helyezük, ahol Boc-Tyr(2-BrZ) vegyületet kapcsolunk hozzá kétszeres szimmetrikus anhidrid kapcsolási reakcióban, amelyben 0,2 mmól aminosavat alkalmazunk. Az N^{alf}-Boc védőcsoportot 50% trifluoecetsav diklórmétános oldattal eltávolítjuk, majd a reakcióelegyet 10%-os diizopropil-etil-aminnal történő mosással diklórmétánban semlegesítjük. Ezután háromszor diklórmétánnal mossuk, majd nitrogénáramban megszáritjuk. A peptidet N^{alf}-szukcinil-csoporttal látjuk el, kétszeres borostyánkősav anhidriddel dimetil-formamidban végzett kapcsolás segítségével, majd háromszor dimetil-formamiddal mossuk, kétszer 10%-os diklórmétános diizopropil-etil-aminnal történő mosással semlegesítjük és végül vákuumban szárítjuk. A peptidről a védőcsoportot eltávolítjuk és a peptidet a gyantáról lehasítjuk vízmentes hidrogénfluorid alkalmazásával, amely 5% anizolt tartalmaz. A hasítási reakciót 60 percig 5 °C-on végezzük. A hidrogénfluoridot vákuumban 0 °C-on elpárologtatjuk, majd a peptidet a gyantáról 25% vizes acetonitrilrel extraháljuk, fagyaszttjuk és liofilizáljuk.

C¹⁸ Beckman, 50,8×150 mm oszlopon preparatív nagynyomású folyadékkromatográfiás elválasztást végzünk lineáris gradiensen 29–6–31,6% acetonitril 0,1% vizes trifluoecetsavban képzett eluenssel 15 percig 80 ml/perc áramlási sebesség alkalmazásával. A fő csúcsot (kijelezve 280 nm értéknél) gyűjtjük és liofilizáljuk. 281 mg kívánt terméket kapunk. A termék homogenitását nagynyomású folyadékkromatográfia segítségével határozzuk meg: Vydac 218TP54 (4,6×250 mm) C¹⁸ oszlop; 2,0 ml/perc; t₀ = 1,5 perc, elúciós idő 15–40% acetonitril lineáris gradiense alkalmazásával 25 perc az oldat 0,1% trifluoecetsav alapú, majd 17,1 perc 0,1% trifluoecetsavas oldat eluens alkalmazása.

A tisztított jelzett peptidek analízise FAB-MS analízisben kívánt molekulaiont szolgáltat és aminosav analízisben a kívánt peptidet mutatja. Az alábbi módon a következő peptideket vizsgáltuk, amik az alábbi fizikai jellemzőkkel rendelkeznek.

A mintákat thrombin bevezetéssel indukált fibrin rögzítő kísérletben inhibíciós vizsgálatnak vetjük alá.

Valamennyi a vizsgálatban alkalmazott oldatot 0,12 mól nátriumkloridot, 0,01 mól nátriumfoszfátot, 0,01% nátriumazidot és 0,1% marha szérumalbumint tartalmazó pH 7,4 pufferrel készítünk. A marhaszérum thrombin koncentrációt megfelelő értékre állítjuk be, hogy a fibrin rögzítő képződést mikrotitráló lemez kijelző segítségével (Bio-Tek EL 309) követhessük 60 perc időtartamon belül 405 nm mellett. A thrombin oldatot (50 mikró 1; 0,2 pmól) a mikrotitráló lemez edényeihez adjuk, amely a tesztelt peptid 50 mikró 1 mennyiségét tartalmaz. 1 perc keverés és 10 perc 24 °C-on történt inkubálás után 100 mikró 1 hígított plazma (1:1) 0,1%-os EDTA oldatban készült elegyét adjuk a keverékhez és örvénykeverésnek vetjük alá 20 mp-ig. Az oldat turbiditását inhibítor nem tartalmazó oldathoz hasonlítottuk és feljegyeztük. Az oldat turbiditását 5 percenként automatikus leolvasón leolvassuk. Az eredményekből IC₅₀ értéket számolunk, ami a peptid azon koncentrációja, ami ahhoz szükséges, hogy az inhibítor nem tartalmazó minta turbiditásának 50%-os csökkenését érjük el. Ez ekvivalens a fibrin rögzítő képződési idő kétszeresre való növekedésével. A kísérletekben, amelyekben emberi, vagy marha thrombint alkalmaztunk, ennek koncentrációját úgy állítottuk meg, hogy 30 perc időtartam alatt ugyanolyan sebességű rögzítő képződést mutassanak. Ezen az értékelési alapon a ++ jelzett peptidek 25 mikromól–200 mikromól, közötti és a +++ jelzett peptidek kisebb mint 25 mikromól IC értéket mutatnak.

1. Suc-Tyr-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
MW 1200 FAB-MS (MH)⁺ 1201
Z(3) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
3,08 1,97 0,96 0,99 0,99
In vitro aktivitás: +
2. H-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH
MW 1370 FAB-MS (MH)⁺ 1371
Z(5) Ile(1) Tyr(1) Gly(1) B(1) Phe(1) Leu(1)
4,93 0,85 0,95 1,09 1,10 1,08 0,99
In vitro aktivitás: +
3. Suc-Tyr-Glu-Pro-Tiq-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
MW 1278 FAB-MS (MH)⁺ 1279
Z(4) Pro(1) Ile(1) Tyr(1) Ala(1) Cha(1)
4,05 0,93 0,96 0,95 1,03 1,03
In vitro aktivitás: ++
- 4) Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Gln-NH₂
MW 1158 FAB-MS (MH)⁺ 1175
Z(4) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
4,15 1,94 0,96 1,01 0,95
In vitro aktivitás: ++
5. Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Cha-Gln-NH₂
MW 1256 FAB-MS (MH)⁺ 1257
Z(4) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
4,15 1,98 0,91 0,97 1,05
In vitro aktivitás: ++
6. Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Ala-Cha-Asn-OH
MW 1184 FAB-MS (MH)⁺ 1185
B(1) Z(2) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
1,02 2,09 1,98 0,93 1,01 0,97

- In vitro aktivitás: ++
7. Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Asn-OH
MW 1161 FAB-MS (MH)⁺ 1162
Z(3) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1) B(1)
3,14 1,95 0,95 1,00 0,96 1,01 5
In vitro aktivitás: ++
8. Mal-Tyr-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
MW 1198 FAB-MS (MH)⁺ 1198
Z(3) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1) 10
3,06 2,01 0,95 0,99 1,01
In vitro aktivitás: +
9. Sulc-Nap-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
MW 1234 FAB-MS (MH)⁺ 1234 15
Z(3) Pro(2) Ile(1) Ala(1)
3,08 2,00 0,94 0,97
In vitro aktivitás: ++
10. Suc-Tyr-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
MW 1232 FAB-MS (MH)⁺ 1233
Z(4) Pro(1) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
4,07 0,99 0,96 0,98 0,99
In vitro aktivitás: +
11. Suc-Tyr-Glu-Pro-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
NW 1216 FAB-MS (MH)⁺ 1217
Z(4) Pro(2) Tyr(1) Ala(1)
4,05 1,97 0,98 1,00
In vitro aktivitás: +
12. Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
MW 1232 FAB-MS (MH)⁺ 1233
Z(4) Pro(1) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
4,10 1,0 0,94 0,96 0,99
In vitro aktivitás: ++
13. Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
MW 1200 FAB-MS (MH)⁺ 1201
Z(3) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
3,16 1,97 0,93 0,96 0,98
In vitro aktivitás: ++
14. Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-D-Glu-OH
MW 1176 FAB-MS (MH)⁺ 1177
Z(4) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
4,08 1,97 0,96 0,99 1,00
In vitro aktivitás: ++
15. Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
MW 1258 FAB-MS (MH)⁺ 1259
Z(4) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
4,10 2,01 0,91 0,98
In vitro aktivitás: ++
16. Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Gln-OH
MW 1175 FAB-MS (MH)⁺ 1175
Z(4) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
4,11 1,98 0,93 1,01 0,97
In vitro aktivitás: ++
17. Suc-Phe-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Gln-NH₂M
W 1158 FAB-MS (MH)⁺ 1159
Z(4) Pro(2) Ile(1) Ala(1) Phe(1)
4,10 2,05 0,93 0,96 0,97
In vitro aktivitás: +
18. Suc-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-OH
MW 1200-FAB MS (MH)⁺ 1201
Glx(3) Pro(2) Ile(1) Tyr(1) Ala(1)
3,10 1,94 0,98 0,99 0,99
In vitro aktivitás: ++
19. Suc-Glu-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-D-Glu-OH
MW 1166 FAB-MS (MH)⁺ 1167
Glx(4) Pro(2) Ile(1) Ala(1)
4,12 1,95 0,96 0,98
In vitro aktivitás: +

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- 20 Eljárás X-A₁-A₂-A₃-A₄-A₅-A₇-A₈-A₉-A₁₀-Y
(1) általános képletű peptidek, vagy gyógyszerészetileg elfogadható sóik előállítására, ahol az általános képletben
- X jelentése amino-végcsoport, amely lehet hidrogénatom, kétértékű 2–8 szénatomszámú alkanoil-, benziloxi-karbonil vagy t-butoxi-karbonilcsoport;
- A₁ jelentése Gly-Asp, Tyr-Pro-Ile-Pro, Tyr-Glu-Pro-Tiq, Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro, Tyr-Glu-Ile-Pro, Npa-Pro-Ile-Pro, Tyr-Glu-Pro-Pro, Tyr-Glu-Pro-Ile, Phe-Glu-Pro-Ile-Pro, vagy Glu-Pro-Ile-Pro;
- A₂ jelentése Phe, SubPhe, pChloroPhe, D-Phe, NMe-Phe vagy egy kötés;
- A₃ jelentése Glu vagy Asp;
- A₄ Glu, Asp, Ala vagy egy kötés;
- 35 A₅ jelentése Ile, Val, Leu, Nle, Ala, D-Leu vagy egy kötés;
- A₇ jelentése Glu, Asp vagy egy kötés;
- A₈ jelentése Glu, Asp vagy egy kötés;
- A₉ jelentése Tyr, I-Tyr, D-Tyr, Cha vagy egy kötés;
- 40 A₁₀ jelentése Asp, D-Asp, Asn, Glu, D-Glu vagy Gln;
- Y jelentése hidroxil- vagy aminocsoport
- azzal jellemezve, hogy*
- i) a C-terminális védett A₁₀ aminosavat egy gyantához kötjük, majd
- 45 ii) sorrendben hozzákötjük az A₉-A₁ csoportnak megfelelő védett aminosavakat, majd
- iii) a védőcsoportot eltávolítjuk és kívánt esetben a kapott peptidet tisztítjuk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, olyan (1)
- 50 általános képletű vegyületek előállítására, ahol az általános képletben A₂ jelentése Phe, *azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.*
3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, olyan (1) általános képletű vegyületek előállítására, ahol az általános képletben A₃ jelentése Glu, *azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.*
4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, olyan (1) általános képletű vegyületek előállítására, ahol az általános
- 60

képletben A_5 jelentése Ile, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, olyan (1) általános képletű vegyület előállítására, ahol az általános képletben A_7 jelentése Glu, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelően szubsztituált kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, olyan (1) általános képletű vegyület előállítására, ahol az általános képletben A_8 jelentése Glu vagy Asp, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás, olyan (1) általános képletű vegyületek előállítására, ahol az általános képletben A_9 jelentése Cha, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, olyan (1) általános képletű vegyületek előállítására, ahol az általános képletben A_{10} jelentése D-Glu, vagy Asn, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, olyan (1) általános képletű vegyületek előállítására, ahol az általános képletben X jelenetése hidrogénatom, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

10. Eljárás véralvadásgátló gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított (1) képletű peptidet, melynél X, Y, A_1 – A_{10} jelentése az 1. igénypontban megadott, gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyaggal összekeverve gyógyszerkészítménnyé alakítjuk.