



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 98558

(22) Заявено на 24.02.94

(24) Начало на действие
на патента от: 09.11.95

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № на

(45) Отпечатано на 29.05.98

(46) Публикувано в бюлетин № 2
на 27.02.98

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):

BIOGEN INC., CAMBRIDGE, MA (US)

(72) Изобретател(и):

John M. Maraganore, Tewksbury, MA

Jo-Ann M. Jablonski, Middleborough, MA

Paul R. Bourdon, Somerville, MA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Румяна Стефанова Слабова, 1124

София, ул. "Леонардо да Винчи" 3

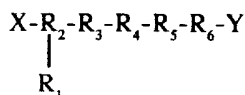
(86) № и дата на PCT заявка:

(87) № и дата на PCT публикация:

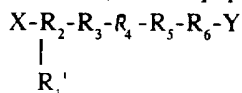
Издава се съгласно §4 от Преходните и заключителните разпоредби на Закона за патентите на основание издаден патент на: US № 5425936 от 20.06.95

(54) ИНХИБИТОРИ НА ТРОМБИНА

(57) Изобретението се отнася до нови биологично активни молекули, които инхибират тромбина и се свързват с него. Молекулите включват компонент, насочен срещу каталитичното място (CSDM), с формула



в която X означава водород или има основна верига, включваща от 1 до 100 атома; R₁ е от групата, състояща се от незаместени, моно-, ди- и тризаместени наситени пръстени структури; R₂ е връзка или има основна верига, състояща се от 1 до 5 атома, R₃ е връзка или е основна верига, състояща се от 1 до 3 атома; R₄ е която и да е аминокиселина; R₅ е всяка L-аминокиселина, която включва гуанидин- или аминокиселина група в страничната верига; R₆ е неамидна връзка, и Y има основна верига, състояща се от 1 до 9 атома, или с формула



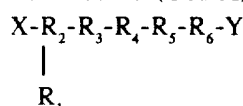
в която R₁' означава групата, състояща се от незаместени, моно-, ди- и тризаместени пръстени структури; R₄ е всяка аминокиселина, включваща в страничната си верига група, способна да образува водородна връзка при pH от 5,5 до 9,5; и X, R₂, R₃, R₅, R₆ и Y се дефинират както е посочено. Предпочитаните тромбинови инхибитори имат още домен за асоциация с анионсвързващо екзомясто (ABEAM) и линкерен участък на дължина между 18Å и 42Å, свързващ Y с ABEAM. Изобретението се отнася още до препарати, комбинации и до методи, използващи молекулите за терапевтични, профилактични и диагностични цели.

3 претенции, 3 фигури

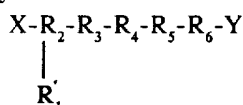
(54) ИНХИБИТОРИ НА ТРОМБИНА

Област на техниката

Настоящото изобретение се отнася до нови биологично активни молекули, които се свързват към и инхибират тромбина. Тези молекули включват насочено към (b) каталитично място количество (CSDM) от формулата



в която X е водород или е верига, състояща се от 1 до 100 атома; R₁ се избира от групата, състояща се от незаместени, моно-, ди- и тризаместени наситени пръстенни структури; R₂ е връзка или е верига, състояща се от 1 до 5 атома; R₃ е връзка или е верига, състояща се от 1 до 3 атома; R₄ е която и да е аминокиселина; R₅ е всяка L-аминокиселина, която включва гуанидин- или аминокиселина група в страничната верига; R₆ е неамидна връзка; и Y е верига, състояща се от 1 до 9 атома; или формулата:



в която R₁ се избира от групата, състояща се от незаместени, моно-, ди- и тризаместени пръстенни структури; R₄ е всяка аминокиселина, включваща в страничната си верига група, характеризираща се с възможността да образува водородна връзка при рН между 5,5 и 9,5; и X, R₂, R₃, R₅, R₆ и Y се дефинират както по-горе. Предпочитаните тромбинови инхибитори се характеризират още с домен за асоциация с анионсвързващо екзомясто (ABEAM) и линкерен участък на дължина между 18Å и 42Å, който свързва Y с ABEAM. Това изобретение се отнася също и до препарати, комбинации и методи, които използват тези молекули за терапевтични, профилактични и диагностични цели.

Предшестващо състояние на техниката

Острите съдови заболявания, такива като инфаркт на миокарда, инсулт, белодробна емболия, тромбоза на дълбоките вени, запушване (оклузия) на периферните артерии и други тромбози на кръвоносната система създават големи здравни рискове. Подобни заболя-

вания се причиняват от частично или пълно запушване на кръвоносен съд със съсирек от кръв, който съдържа фибрин и кръвни плочици (тромбоцити).

Тромбинът е природен белтък, който катализира превръщането на фибриногена във фибрин - крайната стъпка в съсирването на кръвта. Освен че катализира образуването на фибринови съсиреци, тромбинът също така активира агрегацията на тромбоцитите и рилизинговите реакции. Това означава, че тромбинът играе централна роля както в острата тромбоцит-зависима (артериална) тромбоза [S.R. Hanson and L.A. Harker, "Interruption of Acute Platelet-Dependent Thrombosis by the Synthetic Antithrombin D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Aroinyl-chloromethylketone", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp. 3184-88 (1988)], така и във фибрин-зависимата (венозна) тромбоза.

Тромбинът има някои други биорегулаторни роли [J.W.Fenton, II, "Thrombin Bioregulator Functions", Adv. Clin. Enzymol., 6, pp. 186-93 (1988)]. Например, той може да активира директно възпалителен отговор, като стимулира синтеза на тромбоцит-активиращ фактор (PAF) в ендотелните клетки [S.Prescott et al., "Human Endothelial Cells in Culture Produce Platelet-Activating Factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) When Stimulated With Trombin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp. 3534-38 (1984)]. PAF се разполага върху повърхността на ендотелните клетки и служи като лиганд за неутрофилна адхезия и последваща дегранулация [G.M. Vercolletti et al., "Platelet-Activating Factor Primes Neutrophil Responses to Agonists: Role in Promoting Neutrophil-Mediated Endothelial Damage", Blood, 71, pp. 1100-07 (1988)]. Като алтернатива тромбинът може да предизвика възпаление чрез повишаване пропускливостта на съдовете, което може да доведе до едем(а) [P.J. Del Vecchio et al., "Endothelial Monolayer Permeability To Macromolecules", Fed. Proc., 46, pp. 2511-15 (1987)]. Реагенти, които блокират активното място на тромбина, такива като хирудин, преустановяват активирането на тромбоцитите и ендотелните клетки [C.L. Knupp, "Effect of Thrombin Inhibitors on Thrombin-Induced Release and Aggregation", Thrombosis Res., 49, pp. 23-36 (1988)].

Тромбинът участва също и в канцерогенезата поради способността на неговия нативен разграден продукт, фибрина, да служи като

субстрат за туморен растеж [A. Falanga et al., "Isolation and Characterization of Cancer Procoagulant: A Cystein Proteinase from Malignant Tissue", *Biochemistry*, 24, pp. 5558-67 (1985); S.G. Gordon et al., "Cysteine Proteinase Procoagulant From Amnion-Chorion", *Blood*, 66, pp. 1261-65 (1985); и A. Falanga et al., "A New Procoagulant In Acute Leukemia", *Blood*, 71, pp. 870-75 (1988)]. Тромбинът се включва и в невродегенеративните заболявания въз основа на неговата способност да причинява невритна ретракция [D. Gurwitz et al., "Thrombin Modulates and Reverses Neuroblastoma Neurite Outgrowth", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, pp. 3440-44 (1988)]. Ето защо способността за регулиране на *in vivo* активността на тромбина има много важни клинични приложения.

Инхибирането на тромбина представлява един подход за успешно лечение и профилактика на острите съдови заболявания. Вече са известни много типове тромбинови инхибитори. Хепаринът, индиректен инхибитор на тромбина, се прилага широко за лечение на венозна тромбоза. Макар и ефективен срещу фибрин-зависимото кръвосъсирване, хепаринът е слабо ефикасен в инхибирането на тромбин-индуцираното активиране на тромбоцитите. Поради това този медикамент не се използва за лечение на артериални тромбози. Нещо повече, хепаринът предизвиква редица нежелателни странични ефекти, включващи хеморагии (кръвоизливи) и тромбоцитопения.

Хирудинът е природен полипептид, който се произвежда от кръвосмучещата пиявица *Hirudo medicinalis*. Това съединение, което се синтезира в слюнната жлеза на пиявицата, е най-ефективният природен инхибитор на коагулацията, който е известен. Хирудинът предпазва кръвта от коагулация, свързвайки се плътно с тромбина ($K_d = 2 \times 10^{-11} \text{ M}$) е 1 : 1 стехиометричен комплекс [S.R. Stone and J. Hofsteenge, "Kinetics of the Inhibition of Thrombin by Hirudin", *Biochemistry*, 25, pp. 4622-28 (1986)]. Това на практика инхибира катализираното от тромбина превръщане на фибриногена във фибрин (съсирек) и също така потиска всички други тромбин-опосредствани процеси [J.W. Fenton, II, "Regulation of Thrombin Generation and Functions", *Semin. Thromb. Hemost.*, 14, pp. 234-40 (1988)].

Хирудинът инхибира тромбина, свързвайки се с последния на две отделни места.

Първоначално С-краят на хирудина взаимодейства с аннион-свързващото екзомясто (ABE) в тромбина [J.W. Fenton, II et al., "Thrombin Anion Binding Exosite Interactions with Heparin and Various Polyanions", *Ann. New York Acad. Sci.*, 556, pp. 158-65 (1989)]. След това нискоафинитетно свързване, комплексът хирудин-тромбин претърпява конформационно изменение и аминотерминалният участък на тромбина придобива способност за свързване с каталитичното място на тромбина [S. Kono et al., "Analysis of Secondary Structure of Hirudin and the Conformational Change Upon Interaction with Thrombin", *Arch. Biochem. Biophys.*, 267, pp. 158-66 (1988)].

Изолирането, пречистването и аминокиселинната последователност на тромбина са известни [P. Walsmann and F. Markwardt, "Biochemical and Pharmacological Aspects of the Thrombin Inhibitor Hirudin", *Pharmazie*, 36, pp. 653-60 (1981); J. Dodt et al., "The Complete Covalent Structure of Hirudin: Localization of the Disulfide Bonds", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 366, pp. 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 Leech", *Anal. Biochem.*, 161, pp. 514-18 (1987); и R.P. Harvey et al., "Cloning and Expression of a cDNA Coding for the Anti-Coagulant Hirudin from the Blood-sucking Leech, *Hirudo medicinalis*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, pp. 1084-88 (1986)].

В изследвания върху животни хирудинът, пречистен от пиявици, ефективно предотвратява венозната тромбоза, запушване на съдовите шунтове и на тромбин-индуцирана дисеминирана интравазална коагулопатия. Освен това хирудинът проявява слаба токсичност и много кратко време на изчистване (клирънс) от кръвообращението [F. Markwardt et al., "Pharmacological Studies on the Antithrombotic Action of Hirudin in Experimental Animals", *Thromb. Haemost.*, 47, pp. 226-29 (1982)].

Съвсем наскоро хирудинът бе клониран и експресирал в *E. coli* [EP 158 564, EP 168 342 и EP 171 024] и в дрожди EP 200 655. Независимо от тези постижения, хирудинът е все още умерено скъп за производство, а търговията с него не е широко разпространена.

Неотдавна бяха положени усилия за идентифициране на пептидни фрагменти от нативния хирудин или на негови производни, които удължават ефективно и времето на кръво-

съсирване. Такива съединения са описани в EP 276 014, EP 291 982, EP 333 356, EP 341 607 и EP 372 670. Молекулите, описани в тези патентни заявки, показват различна ефективност в инхибирането на кръвосъсирването, но всички са 2 до 4 порядъка по-слабо активни от хирудина. поради това подобни пептидни фрагменти не могат да бъдат напълно задоволителни за разтваряне на кръвните съсиреци в последващите (on-going) режими на лечение.

Описани са съединения, които имитират действието на хирудина чрез свързване както с анион-свързващото екзомясто, така и с каталитичното място на тромбина (US 395 482, сега изоставен и US 5 196 404). Тези съединения показват тромбин-потискаща активност, равна или по-голяма, отколкото нативния хирудин. Те са също така по-малки от хирудина и поради това по-слабо антигенни. Тези инхибитори се произвеждат също и синтетично, което позволява производството на търговски реализируеми количества при приемливи цени.

Независимо от постиженията, продължава да съществува необходимостта от още по-активни тромбинови инхибитори, които могат да се произвеждат евтино и в реални за търговия количества. Такива инхибитори биха били ефективни не само в лечението или предотвратяването на съдово заболяване, но могат също така да намерят терапевтично приложение в лечението на рак, невродегенеративни болести и възпаление.

Техническа същност на изобретението

Съгласно настоящото изобретение се осигуряват молекули, които са потенциални инхибитори на тромбина. Тези молекули са проектирани на основата на триизмерната рентгено-кристалографска структура на комплекс тромбин-инхибитор. Поради това инхибиторите на настоящото изобретение са с пространствена конфигурация, която осигурява най-доброто пасване в триизмерното пространство във и около каталитичното място на тромбина. Като резултат от това се получават молекули, които имат оптимална тромбин-инхибираща активност.

Изобретението осигурява също тромбинови инхибитори, които включват допълнително съставка, която се свързва с анион-свързващото екзомясто на тромбина. Тези инхибитори

имитират количествено действието на хирудина. Тъй като е предвидено тези молекули да имат оптимална пространствена конфигурация, те са по-активни от хирудина. Високата активност на инхибиторите съгласно изобретението позволява те да се прилагат в сравнително по-ниски дози, отколкото тези, които се изискват в режимите за лечение, основаващи се на хирудин.

Молекулите съгласно изобретението могат да се използват в препарати и методи за инхибиране на всяка тромбин-опосредствана (медирана) или тромбин-асоциирана функция или процес. В обхвата на изобретението се включват и фармацевтични препарати, съдържащи тези молекули, както и методи за лечение или профилактика на съдови заболявания, възпаления, карциноми и невродегенеративни заболявания, използвайки тези инхибитори. Тези молекули могат също така да се употребяват в препарати и методи за *ex vivo* сцинтиграфия, за съхраняване и третиране на екстракорпорална кръв и за покриване на инвазивни приспособления. Молекулите съгласно изобретението могат да се въвеждат в пациента в комбинация с фибринолитичен агент, за да се повиши или да се понижи ефикасността на дадена доза от този агент, необходима за даден ефект, например за разтваряне на кръвен съсирек.

Вследствие на факта, че молекулите съгласно настоящото изобретение могат да се получат чрез техники на химичен синтез, е възможно евтино да се произведат търговски реализируеми количества. Нещо повече, тъй като молекулите на настоящото изобретение са значително по-малки, отколкото използваните за медицинско лечение тромбинови инхибитори, по-малко вероятно е те да стимулират нежелателен имунен отговор в пациентите, които се лекуват с тях. В съгласие с това използването на тези тромбинови инхибитори не се ограничава до лечението на остро заболяване. Тези молекули могат също така да се използват в терапията на хронични тромбоемболийни заболявания, такива като атеросклероза и рестеноза след ангиопластика. Молекулите на настоящото изобретение могат също така да се използват в разнообразни други приложения на мястото на известните тромбинови инхибитори, по-специално на хепарина и хирудина.

Както ще стане ясно от описанието, молекулите, препаратите и методите на това изобретение са приложими за лечение и предотвратяване на различни заболявания, дължащи се на нежелателни ефекти на тромбина, както и за диагностични цели.

Кратко описание на фигурите

Фигура 1 показва пространствения модел на комплекса Хирулог-8-тромбин; фигура 2 представя схематично взаимодействието между D-Phe в позиция 1 и про-

Orn - орнитин
Ala - аланин
Leu - левцин
Pro - пролин
Trp - триптофан
Ser - серин
Cys - цистеин
Asn - аспарагин
Asp - аспарагинова киселина
Lys - лизин
His - хистидин
Nra - нафтилаланин
Hyp - хидроксипролин
Ac - ацетил
BOC - тертбутоксикарбонил
Cbz - карбобензилокси
3,4,-dehydroPro-3,4,-
дехидропролин
Tyr(OSO₃H)-тирозин-О-
сулфат
3-,5-diiodoTyr-3-,5-дийодтирозин

Термините всяка аминокиселина или която и да е аминокиселина са взаимозаменяеми и така, както са използвани тук, включват L-изомерите на природните аминокиселини, както и други небелтъчни α-аминокиселини, които обичайно се използват от занимаващите се с пептидна химия, когато се приготвят синтетични аналози на природните аминокиселини. Природните аминокиселини са глицин, аланин, валин, левцин, изолевцин, серин, метионин, треонин, фенилаланин, тирозин, триптофан, цистеин, пролин, хистидин, аспарагинова киселина, аспарагин, глутаминова киселина, глутамин, γ-карбоксиглутаминова киселина, аргинин, орнитин и лизин. Примерите за небел-

тъчни α-аминокиселини включват норлевцин, норвалин, алоизолевцин, хомоаргинин, тиопролин, дехидропролин, хидроксипролин (Hyp), изонипекотинова киселина (Inp), хомосерин, циклохексилглицин (Chg), α-амино-п-маслена киселина (Aba), циклохексилаланин (Cha), аминоксифенилмаслена киселина (Pba), фенилаланини, заместени в орто-, мета- или пара-

позициите на фенилното ядро с една или две от следните групи: (C₁-C₄) алкил, (C₁-C₄) алкокси, халогенни или нитро-групи или заместени с метилендиокси-група: β-2- и 3-тиенилаланин-аланин, β-2- и 3-фуранилаланин, β-2-, 3- и 4-пиридилаланин, β-(бензотиенил-2- и 3-ил)аланин, β-(1- и 2-нафтил)аланин, О-алки-

Подробно описание на изобретението

Навсякъде в описанието и в претенциите са използвани следните общоприети съкращения на аминокиселините:

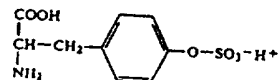
Gly - глицин
Val - валин
Ile - изолевцин
Phe - фенилаланин
Met - метионин
Thr - треонин
Tyr - тирозин
Gln - глутамин
Glu - глутаминова киселина
Arg - аргинин
Nle - норлевцин
Cha - циклохексилаланин
TPro - тиопролин
Suc - сукцинил
Tos - паратолуенсулфонил
Inp - изонипекотинова киселина
Sar - саркозин
(N-метилглицин)
Tyr(SO₃H)-3-сулфотирозин

45

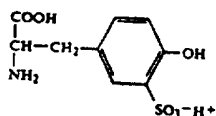
50

лирани производни на серина, треонина или тирозина, S-алкилиран цистеин, S-алкилиран хоmocистеин, O-сулфатни, O-фосфатни и O-карбоксилатни естери на тирозина, 3- и 5-сулфотирозина, 3- и 5-карбокситирозина, 3- и 5-фосфотирозина, 4-метансулфонатен естер на тирозина, 4-метанфосфонатен естер на тирозина, 4-фенилоцетна киселина, 3,5-дийодтирозин, 3- и 5-нитротирозин, ε-алкиллизин, Δ-алкилорнитин и D-изомери на всяка от горните аминокиселини. Всички аминокиселини, цитирани в тази заявка, са в L-форма, освен ако специално не е отбелязано друго.

Съединенията, означавани тук като тирозин-О-сулфат, $\text{Tyr}(\text{OSO}_3\text{H})$ и О-сулфатен естер на тирозина, са идентични и имат структурната формула:



Съединенията, означавани тук като Туг(SO_3H), 3-сулфотирозин и 5-сулфотирозин са идентични и имат структурната формула:



Терминът пациент така, както се използва в тази заявка, се отнася до всички бозайници, по-специално до хора.

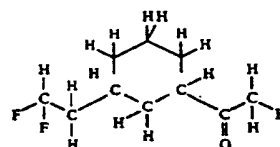
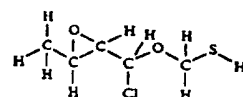
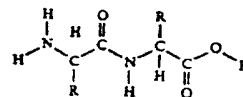
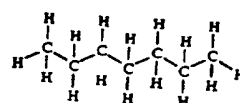
Терминът анионна аминокиселина така, както се използва тук, означава мета-, пара- или орто-, моно- или дизаместен фенилаланин, циклохексилаланин или тирозин, съдържащ отрицателно заредена група, както и S-алкилиран цистеин, S-алкилиран хомоцистеин, γ-карбоксиглутаминова киселина, ε-алкиллизин, Δ-алкилорнитин, глутаминова киселина и аспагинова киселина. Примери за анионни аминокиселини са О-сулфатни, О-фосфатни и О-карбоксилатни естери на тирозина, 3- и 5-сулфотирозина, 3- и 5-карботирозина, 3- и 5-фосфотирозина, 4-метансулфонатен естер на тирозина, 4-метанфосфонатен естер на тирозина, 4-фенилоцетна киселина, 3,5-дийодтирозин и 3- и 5-нитротирозин.

Термините каталитично място, активно място и бразда на активното място така, както се използват, всеки от тях се отнася до всички или до което и да е от следните места в тромбина: субстрат-свързващото или S_1 място; хидрофобното свързващо или масно място; и мястото, където в действителност се извършва

разграждането на субстрата (място на смяна на товара).

Терминът основна верига така, както се използва тук, се отнася за участък от химична структура, който дефинира най-малкия брой последователни връзки, които могат да бъдат проследени от единия до другия край на тази химична структура. Атомите, които изграждат тази верига, могат да включват всякакви атоми, които са в състояние да образуват връзки с най-малко два други атома.

Например всяка от следните химични структури се характеризира с основна верига от 7 атома.

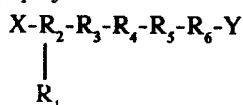


Терминът изчислена дължина в описанието се отнася до предварително зададена дължина, получена чрез сумиране дължините на връзките между атомите, които образуват основната верига. Дължините на връзките между всеки два дадени атома са добре известни [виж например, CRC Handbook of Chemistry and Physics, 65th Edition, R.C. Weist, ed., CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., pp. F-166-70 (1984)].

Заявителите са анализирали структурата на комплекса тромбин—Хирулог-8- чрез триизмерна рентгенова кристалография. Хирулог-8 е инхибитор, който се свързва както с анион-свързващото екзомясто, така и с каталитичното място на тромбина. Той има формулата: (D-Phe)-Pro-Arg-Pro-(Gly)₄-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Tyr-Leu. Синтезата на това съединение е описана в US 395 482, сега изоставена и в пример 2 на тази заявка. Тези кристалографски данни разкриват някои структурни особености във и около активното мяс-

то на тромбина, които са възлови за проектирането на подобрените тромбинови инхибитори съгласно изобретението.

Една от тези структурни особености представлява хидрофобната бразда в тромбина в съседство с неговия каталитичен център. В Хирулог-8 N-крайният D-Phe-остатък, по-специално фенилният пръстен на тази аминокиселина, заема това място. Заместването на ненаситения пръстен с наситен засилва липофилните взаимодействия с тромбина, като по този начин повишава инхибиращия потенциал. Затова, съгласно едно приложение на настоящото изобретение, тромбиновият инхибитор има формулата:



в която X е водород или основна верига, състояща се от 1 до 100 атома; R₁ се избира от групата, състояща се от незаместени, моно-, ди- и тризаместени наситени хомоциклични или хетероциклични пръстенни структури; R₂ е връзка или основна верига, състояща се от 1 до 5 атома; R₃ е връзка или основна верига, състояща се от 1 до 3 атома; R₄ е която и да е аминокиселина; R₅ е всяка L-аминокиселина, която включва гуанидин- или аминосъдържаща група в страничната верига; R₆ е неамидна връзка; и Y е основна верига, състояща се от 1 до 9 атома. Примери за L-аминокиселини, които включват гуанидин- или аминосъдържащи странични вериги, са аргинин, лизин и орнитин.

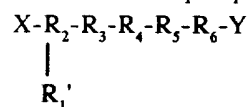
Предпочита се наситената хомоциклична или хетероциклична пръстенна структура да се достави от D-циклохексилаланин (D-Cha), монозаместен D-Cha, дизаместен D-Cha или тризаместен D-Cha остатък (например, X е H₂N; R₁ е CH₂-CH; и R₃ е C=O). За предпочитане X е H₂N; R₁ е циклохексан; R₂ е CH₂-CH; R₃ е C=O; R₄ е пролин; R₅ е аргинин и Y е пролин.

Наличието на неамидна връзка при R₆ забавя или възпрепятства разграждането на инхибитора от тромбина. Компонентът на неамидната връзка може да се образува чрез химично модифициране на амидна връзка. Това може да се постигне чрез методи, които са добре известни [M. Szelke et al., "Potent New Inhibitors of Human Renin", Nature, 299, pp. 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, pp. 143-46 (1987)]. Когато неамидната връзка се формира по този начин, се предпочита химичната модификация да се извърши преди прибавянето на участъка от молекулата, съдържащ тази връзка, към остатъка от тромбиновия инхибитор. По този начин частта, съдържаща тази неамидна връзка, може да се добави en bloc в единична синтетична стъпка към останалата част от инхибитора.

В най-предпочетеното приложение R₅ е Arg и Y е Pro. В това приложение R₆ е природна имидна връзка, която бавно се разкъсва от тромбина. Така се избягва необходимостта от предварително формиране на неамидна връзка и се допуска Y и R₆ да се прибавят към останалата част на инхибитора по-скоро последователно, отколкото en bloc.

По-нататъшен анализ на кристалографската структура на Хирулог-8-тромбин показва, че връзката на пролина с D-Phe на Хирулог-8 е на разстояние в рамките на 3,46 Å от хидроксилната група на Tyr76 в тромбина. Тъй като това разстояние е достатъчно близко, за да се образува водородна връзка, заместването на Pro в тази позиция с аминокиселина, включваща в страничната си верига група, характеризираща се с възможността да образува водородна връзка при pH между приблизително 5,5 и 9,5, би повишило афинитета на свързване на инхибитора. Съгласно това, друго приложение на това изобретение представлява тромбинов инхибитор с формулата:



в която R₁' се избира от групата, състояща се от незаместени, моно-, ди- и тризаместени наситени пръстенни структури; R₂ е връзка или основна верига, състояща се от 1 до 5 атома; R₃ е връзка или основна верига, състояща се от 1 до 3 атома; R₄ е всяка аминокиселина, включваща в страничната верига група, която се характеризира с възможността да образува водородна връзка при pH между около 5,5 и 9,5; R₅ е всяка L-аминокиселина, която включва гуанидин- или аминосъдържаща група в страничната верига; R₆ е неамидна връзка;

и Y е основна верига, състояща се от 1 до 9 атома.

Добре познати са аминокиселините, съдържащи в страничната си верига група, образуваша водородна връзка при pH между приблизително 5,5 и 9,5. Например, хистидинът, който съдържа имидазолен азот, тиролинът, който съдържа тиолова група, и изонипекотиновата киселина, която съдържа карбоксилатна странична група, са известни акцептори на водородни връзки при pH 5,5 до 9,5.

По-предпочетените тромбинови инхибитори, съгласно това приложение, включват незаместен, моно-, ди- и тризаместен в позицията R₁' циклохексан. За предпочитане X е H₂N, R₁' е циклохексан, R₂ е CH₂-CH и R₃ е C=O, като получената аминокиселина, формирана от X, R₁', R₂ и R₃, е в D-конфигурация (т.е., D-Cha).

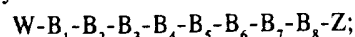
В друго предпочетено приложение тромбиновият инхибитор съгласно изобретението допълнително се състои от компонент за асоцииране с анионсвързващото екзомясто (ABEAM) и линкер, свързан от едната страна с Y и с ABEAM от другата. Подобни тромбинови инхибитори са описани в US 549 388, подаден на 6.07.1990 г. и US 5 196 404; и US 395 482, подаден на 18.08.1989 г., сега изоставен. И двете заявки са включени в литературните източници, но описаните инхибитори изненадващо и неочаквано се оказват по-активни.

В това приложение линкерната област на инхибитора обезпечава мост между CSDM и ABEAM. В съответствие с това от първостепенна важност е по-скоро дължината на линкера, отколкото неговата структура. Изчислената дължина на основната верига, която характеризира линкера, трябва да бъде най-малко около 18Å - разстоянието между каталитичното място и анионсвързващото екзомясто на тромбина - и по-малко от около 42Å.

Основната верига на линкера може да включва всякакви атоми, които са в състояние да свързват най-малко два други атома. Основната верига се състои предимно от всяка химически възможна комбинация от атоми, които се избират от кислород, въглерод, азот и сяра. Известно е коя комбинация от горните атоми в основната верига попада в рамките на изискваната дължина, основавайки се на известните разстояния между различните връзки [виж например, R.T. Morrison and R.N. Boyd,

Organic Chemistry, 3rd Edition, Allyn and Bacon, Inc., Boston, Mass. (1977)]. Съгласно предпочетено приложение линкерът е пептид, който включва аминокиселинната последователност Gly-Gly-Gly-Asn-Gly-Asp-Phe. Предпочита се аминокиселината, свързана с ABEAM-компонента, да бъде Phe.

Третият домен на тези предпочетени тромбинови инхибитори е ABEAM, който се свързва с анионсвързващото екзомясто на тромбина. Предпочита се ABEAM да има формулата:



в която W е връзка; B₁ е анионна аминокиселина; B₂ е която и да е аминокиселина; B₃ е Ile, Val, Leu, Nle или Phe; B₄ е Pro, Нур, 3,4-дехидроPro, тиазолидин-4-карбоксилат, Sar, всяка N-метилова аминокиселина или D-Ala; B₅ е анионна аминокиселина; B₆ е анионна аминокиселина; B₇ е липофилна аминокиселина, избрана от групата, състояща се от Tyr, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha, Pro или дипептид, състоящ се от една от тези липофилни аминокиселини и която и да е аминокиселина; B₈ е връзка или пептид, съдържащ от един до пет остатъка на която и да е аминокиселина; и Z е OH или се характеризира с основна верига, състояща се от между 1 и 6 атома.

Пептиди, които са хомоложни на карбокситерминалния участък на хирудина, се свързват с анионсвързващото екзомясто върху тромбина [US 314 756 и J. M. Maraganore et al., "Anticoagulant Activity of Synthetic Hirudin Peptides", J. Biol. Chem., 264, pp. 8692-98 (1989); и двете от които са включени тук чрез цитатите].

Съгласно предпочетено приложение на това изобретение, ABEAM е хомоложен на аминокиселини 56-64 на хирудина, т.е., B₁ е Glu; B₂ е Glu; B₃ е Ile; B₄ е Pro; B₅ е Glu; B₆ е Glu; B₇ е Tyr-Leu, Tyr(SO₃H)-Leu, Tyr(OSO₃H)-Leu или (3-,5-дийодTyr)-Leu; B₈ е връзка; и Z е OH. Нативният хирудин съдържа Tyr(OSO₃H) в позиция 63. Карбокситерминалните хирудинови пептиди обаче, които съдържат Tyr(SO₃H), имат идентична антикоагулантна активност, както тези, които съдържат нативния Tyr(OSO₃H) [US 314 756].

Други ABEAM-компоненти в обхвата на това изобретение могат да включват онези участъци от всяка молекула, за които е из-

вестно, че се свързват с анион-свързващото място на тромбина. Те включват аминокиселини 1675-1686 на Фактор V, аминокиселини 272-285 на тромбоцитния гликопротеин Ib, аминокиселини 415-428 на тромбомодулина, аминокиселини 245-259 на протромбиновия Фрагмент 2 и аминокиселини 30 до 44 на А α -веригата на фибриногена. Освен това ABEAM-компонентът може да бъде избран от всеки от хирудиновите пептидни аналози, описани от J.L. Krstenansky et al, "Development of MDL-28,050, A Small Stable Antithrombin Agent Based On A Functional Domain of the Leech Protein, Hirudin", *Thromb. Haemostas.*, 63, pp. 208-14 (1990), особено тези, включващи последователността Asp-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-Cha-(D-Glu).

Тромбиновите инхибитори според настоящото изобретение могат да се синтезират по различни методи, които са добре известни. Те включват метода на органичен химичен синтез, твърдофазова пептидна синтеза, разтвор-фазова пептидна синтеза или комбинация от тези методи. Участващи на някои от инхибиторите на това изобретение могат също така да се получат и по други методи, такива като ензимно разкъсване на природен или рекомбинантен хирудин или чрез рекомбинантни ДНК-техники. Тези участващи след това могат да се свържат със синтетично получените участъци на инхибитора, за да се получи крайният продукт, съгласно изобретението. Изборът на метода за синтеза, разбира се, ще зависи от състава на конкретния инхибитор.

Според предпочитано приложение на това изобретение тромбиновият инхибитор се синтезира чрез смесен хетероложен/твърдофазов синтез, включващ твърдофазовия синтез на целия или на по-голямата част от пептидния участък на молекулата, следван от добавянето на неаминокиселинни компоненти. Неаминокиселината може да бъде присъединена към пептидния участък чрез твърдофазови или разтвор-фазови методи. По подобен начин всички останали пептидни участъци могат също да се добавят чрез твърдофазови или разтвор-фазови методи. Това създава най-ефективните методи за евтино производство на промишлени количества от тези молекули.

Когато в тромбиновия инхибитор на това изобретение се съдържат небелтъчни аминокиселини, те могат да се добавят или директно

към растящата верига по време на пептидната синтеза или да се получат чрез химична модификация на изцяло синтезирания пептид в зависимост от естеството на желаната небелтъчна аминокиселина. Специалистите по химичен синтез добре знаят, кои небелтъчни аминокиселини могат да се добавят директно и кои трябва да се синтезират чрез химично модифициране на завършената пептидна верига след пептидната синтеза.

Молекулите на настоящото изобретение проявяват потенциална антикоагулантна активност. Последната може да се тества *in vitro*, като се използва всеки конвенционален метод. Предпочита се тестът за антикоагулантна активност да включва директно определяне на тромбин-инхибиращата активност на молекулата. По такъв метод се измерва инхибирането на катализираното от тромбина разграждане на колориметрични субстрати или за предпочитане се измерва покачването на тромбиновите времена или нарастването на активираните частични тромбопластинови времена в човешка плазма. Последният тест измерва фактори в иманентния път на коагулацията. Като алтернатива прилаганият тест може да ползва пречистен тромбин или фибриноген за измерване инхибирането на рилизинга на фибринопептиди А или В чрез радиоимунологичен тест или чрез ELISA (ензимно-свързан имуносорбентен тест).

Антитромбоцитната активност на молекулите на това изобретение може също така да се измери чрез някой от поредица конвенционални тромбоцитни тестове. Предпочита се тестът да измерва промяна в степента на агрегация на тромбоцитите или промяна в отделянето на тромбоцитни секреторни компоненти в присъствието на тромбин. Първото може да се измери в агрегометър. Последното може да се измери, като се използват техники на RIA (радиоимунологичен тест) или ELISA, специфични за секретирания компонент.

Молекулите на настоящото изобретение са приложими в препарати, комбинирани препарати и методи за лечение и профилактика на различни заболявания, дължащи се на тромбин-опосредствани или тромбин-асоциирани функции и процеси. Те включват инфаркт на миокарда, инсулт, белодробна емболия, тромбоза на дълбоките вени, запушване на периферните артерии, рестеноза след артериално

увреждане или след инвазивни кардиологични процедури, остра или хронична атеросклероза, едем(а) и възпаления, различни клетъчни регулаторни процеси (напр., секреция, промени във формата, пролиферация), рак и метастази, невродегенеративни заболявания.

Тромбиновите инхибитори на настоящото изобретение могат да се включат в лекарствени препарати, като се използват конвенционални методи за приготвяне на фармацевтично приложими препарати, такива като добавяне на фармацевтично приемлив носител. Тези препарати и методите за тяхната употреба могат да се използват за лечение или предотвратяване на тромботични заболявания.

Съгласно алтернативно приложение на настоящото изобретение тромбиновите инхибитори могат да се прилагат в комбинирани и други препарати, и методи за лечение на тромботични заболявания и за понижаване на дозата тромболитичен агент, която е необходима за установяване на реперфузия или за преустановяване на реоклузия. Освен това тромбиновите инхибитори съгласно изобретението могат да се използват в комбинирани и други препарати, и методи за намаляване на реперфузионното време или за покачване на времето за реоклузия при пациент, лекуван с тромболитичен агент. Препаратите включват фармацевтично ефективно количество от тромбинов инхибитор съгласно настоящото изобретение и фармацевтично ефективно количество от тромболитичен агент.

В тези комбинирани и други препарати тромбиновият инхибитор и тромболитичният агент действат по взаимно допълващ се начин за разтваряне на съсиреците от кръв, което води до понижаване на реперфузионното време и до удължаване на времената за реоклузия при пациент, който се лекува с тях. По-конкретно тромболитичният агент разтваря съсирека, докато тромбиновият инхибитор предпазва наново открития, захванат от съсирека или свързан с него тромбин от регенерация на съсирека. Използването на тромбиновия инхибитор в комбинираните препарати и в другите препарати на това изобретение има това предимство, че позволява прилагането на тромболитичен реагент в дози, за които преди се е смятало, че са твърде ниски, за да доведат до тромболитични ефекти, ако се прилагат сами. Така се избягват някои от нежелателните стра-

нични ефекти, свързани с използването на тромболитични агенти, такива като усложнения при кървене.

Тромболитичните агенти, които могат да се употребяват в комбинираните препарати и в препаратите на настоящото изобретение са известни. Такива агенти включват тъканен плазминогенен активатор, пречистен от природни източници, рекомбинантен тъканен плазминогенен активатор, стрептокиназа, урокиназа, проурокиназа, анизолиран комплекс стрептокиназа-плазминогенен активатор (ASPAC), плазминогенни активатори от животински слюнни жлези и известни, биологично активни производни на всеки от горните агенти.

Терминът комбиниран препарат така, както се използва тук, включва единична доза форма, съдържаща поне един тромбинов инхибитор на това изобретение и поне един тромболитичен агент; множествена доза форма, при която тромбиновият инхибитор и тромболитичният агент се прилагат поотделно, но конкурентно; или множествена доза форма, при която двата компонента се прилагат поотделно, но последователно. При последователното приложение тромбиновият инхибитор може да се даде по време на период, обхващащ от около 5 часа преди до около 5 часа след прилагането на тромболитичния агент. Предпочита се тромбиновият инхибитор да се въведе в пациента по време на период, обхващащ от 2 часа преди до 2 часа след прилагането на тромболитичния агент.

Като алтернатива тромбиновият инхибитор и тромболитичният агент могат да бъдат под формата на единична, конюгирана молекула. Конюгирането на двата компонента може да се постигне чрез стандартни техники на кръстосано свързване, които са добре известни. Самостоятелната молекула може също така да приеме формата на рекомбинантен слят белтък, ако тромбиновият инхибитор и тромболитичният агент са пептиди.

Препаратите, включително комбинираните, съгласно изобретението се прилагат парентерално, орално и локално. Те се въвеждат в пациента във всяка фармацевтично приемлива доза форма, включително такива, които могат да се въведат в пациент интравенозно наведнъж (болус) или чрез непрекъснато вливане (инфузия), интрамускулно -

включващо паравертебрално и периапартуларно - субкутанно, интракутанно, интраартикуларно, интрасиновиално, интратекално, интралезионално, периостално или чрез орални, назални или локални методи. Предпочита се препаратите, включително комбинирани, да се адаптират за локално, назално, орално и парентерално приложение, като за предпочитане е тяхното приготвяне за парентерално приложение.

Най-препоръчително е парентералните препарати да се прилагат интравенозно или под формата на еднократно въвеждане (болус) или като постоянно вливане. Ако тромбиновият инхибитор се използва като антитромбоцитно съединение, се предпочита субкутанна или интравенозна еднократна инжекция. За парентерално приложение се приготвят течни форми от единични дози, които съдържат тромбинов инхибитор на настоящото изобретение и стерилна вехикулум. Тромбиновият инхибитор може да се суспендира или да се разтвори в зависимост от природата на вехикулума и от природата на конкретния тромбинов инхибитор. Парентералните препарати обикновено се приготвят чрез разтваряне на тромбиновия инхибитор във вехикулум, възможно е и заедно с други компоненти, стерилизиране чрез филтруване преди напълване на подходящи флакони или ампули и затваряне. Предпочита се във вехикулума да се разтворят също и адюванти, такива като локални анестетици, консерванти и буферизиращи агенти. Препаратът може след това да бъде замразен или лиофилизиран за повишаване на стабилността.

Парентералните суспензии се приготвят по същия начин, с тази разлика, че активният компонент по-скоро се суспендира, отколкото разтваря във вехикулума. Предпочита се стерилизирането на препаратите да се постигне чрез обработване с етиленов окис преди суспендиране в стерилния вехикулум. Предимства носи включването на повърхностно активни вещества или овлажняващи агенти в препарата за улесняване на равномерното разпределение на неговите компоненти.

Таблетки или капсули за орално приложение могат да съдържат конвенционални ексципиенти, такива като слепващи агенти, пълнители, разтворители, таблетиращи агенти, лубриканти, дезинтегранти и овлажняващи агенти. Таблетката може да бъде покрита съг-

ласно добре известни методи. Подходящите пълнители, които могат да се използват, включват целулоза, манитол, лактоза и други подобни агенти. Подходящите дезинтегранти може да включват скорбяла, поливинилпиролон и производни на скорбялата, такива като натриев скорбелен гликолат. Подходящите лубриканти включват, например, магнезиев стеарат. Подходящите овлажняващи агенти включват натриев лаурилсулфат.

Оралните течни препарати могат да бъдат под формата на водни или маслени суспензии, разтвори, емулсии, сиропи или елексири или могат да бъдат представени като сухи продукти за реконституиране с вода или друг подходящ вехикулум. Такива течни препарати могат да съдържат конвенционални добавки. Последните включват суспендиращи агенти; такива като сорбитол, сироп, метилцелулоза, желатин, хидроксиетилцелулоза, карбоксиметилцелулоза, алуминиево стеаратен гел, хидрогенизирани едливи масти; емулгиращи агенти, които включват литин, сорбитанмоноолеат, полиетиленгликоли или сенегалска смола; неводни вехикулуми, такива като бадемово масло, фракционирано кокосово масло и мастни естери; и консерванти, такива като метилов или пропилов р-хидроксibenзоат или сорбинова киселина.

Препаратите, приготвени за локално приложение, могат, например, да бъдат във водно желе, маслена суспензия или под формата на емулгиран мехлем.

Дозировката и режимът на дозиране на тромбиновия инхибитор ще зависи от различни фактори, такива като теглото на пациента, специфичния фармацевтичен препарат, който се използва, целта на лечение, т.е., терапия или профилактика, природата на тромботичното заболяване, което се лекува, и преценката на лекуващия лекар.

Съгласно настоящото изобретение се предпочита фармацевтично ефективна дневна доза от тромбиновия инхибитор на това изобретение между 0,5 до 2,5 nmol/kg телесно тегло на пациента. В препарати, съдържащи тромболитичен агент, фармацевтично ефективната дневна доза на тромболитика е между около 10 и 80 % от конвенционалната доза. Конвенционалната доза на тромболитичен агент е дневната доза, която се използва, когато агентът се прилага в монотерапия. [Physician's Desk

Reference 1989, 43rd Edition, Edward R. Barnhart, publisher]. Тази конвенционална доза варира в зависимост от използвания тромболитичен агент. Примерите за конвенционални дози са следните: урокиназа - 500 000 до 6 250 000 5 единици/пациент; стрептокиназа - 140 000 до 2 500 000 единици/пациент; tPA - 0,5 до 5,0 mg/kg телесно тегло; ASPAC - 0,1 до 10 единици/kg телесно тегло.

Най-често се предпочита терапевтични- 10 те и профилактични препарати на настоящото изобретение да включват доза от тромбиновия инхибитор между около 5 nmol/kg телесно тегло и около 250 nmol/kg телесно тегло. Най-предпочитаните препарати включват същото 15 количество от тромбиновия инхибитор и между 10 и 70 % от конвенционалната доза на тромболитичен агент. Би трябвало да се разбере също, че дневната фармацевтично ефектив- 20 на доза както на тромбиновия инхибитор на това изобретение, така и на тромболитичния агент, в комбинирани препарати на изобретението, могат да бъдат под или над специфичните граници, цитирани по-горе.

След като веднъж настъпи подобрене в 25 състоянието на пациента, ако е необходимо, се прилага поддържаща доза от комбиниран или друг препарат съгласно изобретението. Впоследствие дозата или честотата на приложение или и двете могат да се редуцират като функция от 30 симптомите до ниво, при което подобреното състояние се запазва. След като симптомите се облекчат до желаното ниво, лечението би трябвало да се прекрати. Възможно е да се наложи обаче интермитентно лечение след всяко рецидивирание на болестните симптоми.

Съгласно алтернативно приложение на 40 това изобретение тромбиновите инхибитори могат да се използват в препарати и методи за покриване повърхностите на инвазивни приспособления, което води до по-малък риск от формиране на съсиреци или активиране на тромбоцитите при пациенти, в които се въвеждат такива приспособления. Повърхности, които мо- 45 гат да се покрят с препаратите съгласно изобретението включват, например, протези, изкуствени клапи, присадки и катетри. Методите и препаратите за покриване на тези повърхности са познати на специалистите. Те включват химично кръстосано свързване и фи- 50 зическа адсорбция на препаратите, съдържащи тромбинов инхибитор, върху повърхности-

те на приспособленията.

Съгласно следващо приложение на нас- 5 тоящото изобретение тромбиновите инхибитори могат да се използват за ex vivo сцинтиграфия на тромб в пациент. В това приложение тромбиновият инхибитор се бележи с радиоизотоп. Изборът на радиоизотоп се основава на редица добре известни фактори, например, токсичност, биологичен полуживот, 10 детектируемост. Предпочетените радиоизотопи включват, но не се ограничават до, ^{125}I , ^{123}I и ^{111}In . Техниките за маркиране на тромбиновия инхибитор са добре известни. Най-често се предпочита радиоизотопът да бъде ^{123}I и мар- 15 кирането да се осъществи, като се използва реагентът ^{123}I -Bolton-Hunter. Маркираният тромбинов инхибитор се въвежда в пациента и се оставя да се свърже с тромбина, съдържащ се в съсирек. Съсирекът след това се наблюдава, като се използват добре известни 20 методи за детекция, такива като камера, която е в състояние да детектира радиоактивност, свързана със система за компютърно получаване на образ. Тази техника дава също така представа и за тромбоцит-свързания тромбин и мезотромбин.

Настоящото изобретение се отнася съ- 25 що и до препарати, съдържащи тромбиновите инхибитори съгласно изобретението и до методи за използване на такива препарати за лечението на туморни метастази. Ефикасността на тромбиновите инхибитори за лече- 30 нието на туморни метастази се демонстрира от инхибирането на метастазния растеж. Това се основава на наличието на прокагулантен ензим в определени ракови клетки. Този ензим активира превръщането на Фактор X във Фактор Ха в коагулационната каскада, което 35 води до отлагането на фибрина, който фактически служи като субстрат за туморен растеж. Чрез инхибиране на фибриновото отлагане чрез инхибирането на тромбина молекулите от изобретението служат като ефективни агенти 40 против метастатични тумори. Примерите на метастатични тумори, които могат да се лекуват с тромбиновите инхибитори на това изобретение включват, без да се ограничават, карцином на мозъка, карцином на черния дроб, карцином на белия дроб, остеокарцином и 45 плазмоцитом.

Изобретението се отнася също и до ме- 50 тоди и препарати, използващи по-горе описа-

ните тромбинови инхибитори за инхибиране на тромбин-индуцираното активиране на ендотелните клетки. Това инхибиране включва репресията на синтеза на тромбоцит-активиращия фактор (PAF) от ендотелните клетки. Тези препарати и методи имат важно приложение в лечението на заболявания, характеризирани с тромбин-индуцирано възпаление и едем(а), за които се смята, че се опосредстват от PAF. Такива болести включват респираторен дистрес-синдром при възрастни, септичен шок, септицемия и реперфузионно увреждане.

Ранните стадии на септичен шок включват дискретни, остри възпалителни и коагулопатични отговори. Инжектирането на песоглавци с летални дози живи *E.coli* води до драстично понижаване на неутрофилното число, кръвното налягане и хемокрита. Измененията на кръвното налягане и хемокрита са отчасти следствие от развитието на дисеминирана интравасална коагулопатия (DIC), като беше показано, че те се развиват паралелно с консумацията на фибриногена [F.B. Taylor et al., "Protein C Prevents the Coagulopathic and Lethal Effects of *Escherichia coli* Infusion in the Baboon", *J. Clin. Invest.*, 79, pp. 918-25 (1987)]. Неутропенията е резултат от тежките възпалителни отговори, причинени от септичния шок, които водят до рязко покачване нивото на тумор некротичен фактор. Тромбиновите инхибитори съгласно изобретението могат да се използват в препарати и методи за лечение или предотвратяване на DIC при септицемия и други заболявания.

Изобретението се отнася също и до използването на описаните по-горе инхибитори или включващите ги препарати като антикоагуланти за екстракорпорална кръв. Така както се използва тук, терминът "екстракорпорална кръв" включва кръв, отстранена in line от пациент, подложен на екстракорпорално лечение и след това обратно въведена в пациента чрез диализни процедури, филтруване на кръвта или кръвен байпас по време на операция. Терминът включва също така кръвни продукти, които се съхраняват екстракорпорално за евентуално въвеждане в пациент, както и кръв, взета от пациент, за да се използва за различни тестове. Такива продукти включват тотална кръв, плазма или всяка друга кръвна фракция, в която се цели потискането на

коагулацията.

Количеството или концентрацията на тромбинов инхибитор в тези типове препарати се базира на обема на кръвта, която ще се третира, по-специално на тромбиновото съдържание. Предпочита се ефективното количество тромбинов инхибитор съгласно изобретението за предотвратяване на коагулацията в екстракорпорална кръв да бъде от около 0,5 nmol/60 ml екстракорпорална кръв до около 2,5 nmol/60 ml екстракорпорална кръв.

Тромбиновите инхибитори от изобретението могат също така да се използват за инхибиране на тромбин, свързан със съсирек и допринасящ за нарастването на съсирека. Това е особено важно, тъй като обикновено използваните антитромбинови агенти, такива като хепарин и хепарин с ниско молекулно тегло, са неефективни срещу тромбина, свързан в съсирек.

Тромбиновите инхибитори от изобретението могат да се използват в препарати и методи за лечение на невродегенеративни заболявания. Известно е, че тромбинът причинява невритна ретракция, процес, за който се предполага, че има отношение към измененията във формата на мозъчните клетки по посока на тяхното закръгляне и че участва в невродегенеративни заболявания, такива като болестта на Алцхаймер и на Паркинсон.

Следващите примери поясняват изобретението, без да ограничават обхвата му.

Примери за изпълнение на изобретението

Пример 1. Проект на тромбинов инхибитор, способен да блокира каталитичното място и да се свързва с анионсвързващото екзомясто.

Карбокситерминалните хирудинови пептиди блокират ефективно катализираната от тромбина хидролиза на фибриногена, но не и хидролизата на хромогенни субстрати [J.M. Maraganore et al., *J. Biol. Chem.*, 264, pp. 8692-98 (1989)]. Освен това хирудиновите пептиди не неутрализират катализираното от тромбина активиране на Фактори V и VIII [J.W. Fenton, II et al., "Hirudin Inhibition by Thrombin", *Angio. Archiv. Biol.*, 18, p. 27 (1989)].

Хирудиновите пептиди като Туг₆₃-О-сулфат-N-ацетилхирудин₃₃₋₆₄ ("хируген"), показват потенциални инхибиращи ефекти по от-

ношение на индуцираното от тромбина активиране на тромбоцитите *in vitro* [J.A. Jakubowski and J.M. Maraganore, "Inhibition of Thrombin-Induced Platelet Activities By A Synthetic 12 Amino Acid Residue Sulfated Peptide (Hirugen)", *Blood*, 5 р. 1213 (1989)]. Независимо от това, за инхибиране на тромбоцитната тромбоза *in vivo* може да се изисква тромбинов инхибитор, способен да блокира активното място, ако активирането на Фактори V и VIII е критично и представлява скоростноопределящ етап. Този извод се оправдава от резултатите, получени с необратимия тромбинов инхибитор (D-Phe)-Pro-Arg-CH₂Cl [S.R. Hanson and L.A. Harker, "Interruption of Acute Platelet-Dependent Trombosis by the Synthetic Antithrombin D-Phenylalanyl-L-Prolyl-L-Arginyl Chloromethyl Ketone", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, pp. 3184-88 (1988)] и с други обратими тромбинови инхибитори [J.F. Eidt et al., "Thrombin is an 20 Important Mediator of Platelet Aggregation in Stenosed Canine Coronary Arteries with Endothelial Injury", *J. Clin. Invest.*, 84, pp. 18-27 (1989)].

Като се знае, че NH₂-краят на хирудиновите пептиди е близо до Lys-149, се използва триизмерният модел на тромбина [B. Furie, et al., "Computer-Generated Models of Blood Coagulation Factor Xa, Factor IXa, and Thrombin Based Upon Structural Homology with Other Serine 30 Proteases", *J. Biol. Chem.*, 257, pp. 3875-82 (1982)], за да се проектира агент, който: 1) се свързва с анионсвързващото екзомясто на тромбина; и 2) е в състояние да блокира браздата на активното място в тромбина, като инхибира 35 функцията на каталитичните остатъци, намиращи се там.

Определя се минималното разстояние от ε-NH₂ на Lys-149 до β-хидроксилата на Ser-195 - 18-20Å. Базирайки се на дължината от 40 3Å/аминокиселинен остатък, се изчислява, че ще са необходими най-малко 4-7 аминокиселини, за да се присъедини хирудинов пептид, такъв като Tyr₆₃-O-сулфат-хирудин₅₃₋₆₄, към домен, включващ структура за инхибиране на 45 активното място. Предвижда се линкерът да се състои от глицин. Глицинът се избира, за да се постигне най-голяма гъвкавост на линкера в предварителните изследвания. Би трябвало да се знае обаче, че могат да се използват други, 50 по-ригидни биополимерни линкери.

Избира се последователността (D-Phe)-

Pro-Arg-Pro като инхибитор на активното място, тъй като при хидролиза на субстратите тромбинът проявява специфичност към Arg като аминокиселината P₁. Pro следващ Arg (аминокиселината P'₁) образува връзка, която много бавно се разкъсва от тромбина. Проектират се алтернативни пептиди, като се замества този Pro (остатък) с аминокиселината саркозил- или N-метилаланин или чрез химична редукция на Arg-Gly разкъсваща се връзка.

Пример 2. Синтеза на Хирулог-8.

Хирулог-8 има формулата: H-(D-Phe)-Pro-Arg-Pro-(Gly₄)-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-OH. Той се синтезира чрез конвенционална твърдофазова пептидна синтеза, като се използва пептидният синтезатор Applied Biosystems 430 A. Този пептид се синтезира чрез използване на смолата BOC-L-левцин-O-дивинилбензен. Останалите използвани t-BOC-аминокиселини (Peninsula Laboratories, Belmont, Calif.) включват BOC-O-2,6-дихлорбензилтирозин, BOC-L-глутаминова киселина (гама-бензилов естер), BOC-L-пролин, BOC-L-изолевцин, BOC-L-фенилаланин, BOC-L-аспарагинова киселина (β-бензилов естер), BOC-глицин, BOC-L-аспарагин, BOC-D-фенилаланин и BOC-L-аргинин. За да се постигнат по-високи добиви от синтезата, (Gly₄)-линкерният сегмент се присъединява в два цикъла чрез ръчно добавяне на BOC-глицилглицин (Beckman Biosciences, Inc., Philadelphia, Pa.). След завършване на синтезата, пептидът се деблокира напълно и се откачва от дивинилбензеновата смола чрез обработване с безводен HF:p-крезол:етилметилсулфат (10:1:1, об/об/об). След отстраняването от смолата, пептидът се лиофилизира до сухо.

Суровият Хирулог-8 се пречиства чрез обратнофазова HPLC (високоэффективна течна хроматография), като се използва течна система за хроматография Applied Biosystems 151A и колона Vydac C₁₈ (2.2X25 cm). Колоната се уравновесява с 0,1 % TFA/вода и се елуира с линеен градиент на покачваща се концентрация ацетонитрил от 0 до 80 % в 0,1 % TFA в продължение на 45 минути при проточна скорост 4,0 ml/min. Елуентният поток се отчита за поглъщане при 229 nm и фракциите се събират ръчно. Пречистват се 25-30 mg от суровия Хирулог-8 чрез HPLC и се получава 15-20 mg чист пептид.

Потвърждава се структурата на пречисления Хирулог-8 чрез анализи на аминокиселинната последователност. Аминокиселинните хидролизати се получават чрез третиране на пептида с 6N HCl под вакуум при 110°C. След това се анализират хидролизатите чрез йонообменна хроматография и последваща нинхидринова дериватизация/детекция, като се използва автоматизираният анализатор Beckman 6300. Провежда се секвенционен анализ чрез автоматизирано Едманово разграждане в газ-фазов секвенатор Applied Biosystems 470A, оборудван със системата данни Model 900A. Фенилтиохидантионовите киселини (PTH) се анализират on-line чрез използване на PTH-анализатор Applied Biosystems 120A и PTH- C_{18} -колона (2,1X220 cm).

Пример 3. Проект на Хирулози, замесени в позиции 1 и 2. Получава се рентгено-кристалографската структура на комплекса Хирулог-8:тромбин чрез следните стъпки. Първо се получават кристали от комплекса Хирулог-8:тромбин с подходящо качество за получаване на високоразделителен дифракционен профил. После, използвайки тези кристали, се събират данните от дифрактометрията. Накрая се определя триизмерната структура на комплекса Хирулог-8:тромбин, като се използват методите на молекулно заместваща ротация/транслация, ползвайки координатите на PPACK:тромбин [W. Bode et al., "The Refined 1,9Å Crystal Structure of Human α -Thrombin: Interaction With D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketone and Significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp Insertion Segment", EMBO J., 8, pp. 4367-75 (1989)] и на комплексите хирудин:тромбин [T.J. Rydel et al., "The Structure of a Complex of Recombinant Hirudin and Human α -Thrombin", Science, 249, pp. 277-80, (1990)]. Както е показано на фиг.1, структурата на Хирулог-8, свързан с тромбин, се разчита чрез разчитане на последователността D-Phe-Pro-Arg на CSDM и на сегмента Asp-Phe-Glu-Glu-Ile на ABEAM.

На фиг.1 тромбинът е представен в бяло, с изключение на неговото активно място, което е показано с плътни точки. Хирулог-8 се означава с пръснати точки. Участъкът от Хирулог-8 от лявата страна най-близо до активното място на тромбина е CSDM. Участъкът от дясната страна е ABEAM. Другите аминокиселини на Хирулог-8 не са показани на

фиг.1, тъй като съответстващите им електронни плътности не може да се определят.

Изследването на CSDM-участъка от структурата Хирулог-8:тромбин показва разположението на аминокиселината от първа позиция (D-Phe) в хидрофобната бразда, формирана от His57, Tyr60A, Trp60D, Leu99, Ile174 и Trp215 (фиг.2). На фиг.2 тромбинът е представен с непрекъснати линии, а Хирулог-8 с прекъснати линии. Разположението на остатъка D-Phe в браздата предполага, че замествания в позиция 1, които усилват липофилните контакти, биха довели до повишен афинитет на свързване на CSDM-компонента в тромбиновите инхибитори съгласно изобретението. Съответно на това, се замества D-Phe-остатъкът на Хирулог-8 или с D-нафтилаланин (D-NPA) или с D-циклохексилаланин (D-Cha), за да се образуват D-NPA-Хирулог-8 и D-Cha-Хирулог-8, респективно.

Намерено бе също, че свързването на CSDM на Хирулог-8 с каталитичното място на тромбина включва аполярни взаимодействия между първия пролин на инхибитора (съседен на D-Phe) и бразда, дефинирана от His57, Tyr60A и Tyr60D на тромбина (фиг.2). Освен това намерено бе, че този пролин се намира в рамките на 3,46Å от фенолната хидроксилна група на тромбиновия Tyr60A (фиг.2). На фиг.2 тромбинът е означен с непрекъснати линии, а Хирулог-8 - с прекъснати линии.

Близостта на този пролин с Tyr60A на тромбина предполага възможността за формиране на водородна връзка между тях. Чрез заместване на пролина с аминокиселина, способна да образува водородни връзки, може да се повиши стабилността на свързването на CSDM с активното място на тромбина. Това на практика би повишило инхибиращата активност на такава една молекула. Поради това се замества пролина на Хирулог-8 с L-хистидин (His₂-Хирулог-8), L-тиопролин (TPro₂-Хирулог-8) или изонипекотинова киселина (Inp₂-Хирулог-8). Всяка от тези субституции въвежда акцептор на водородна връзка в позиция 2 (R'₄-компонент) на тромбиновите инхибитори на това изобретение (т.е., имидазол-ен азот, тиол и карбоксилат, съответно).

Пример 4. Синтеза на Хирулози, замесени в позиция 1.

D-Npa-Хирулог-8 се синтезира по същия начин, както Хирулог-8 (Пример 2) с та-

зи разлика, че в последния цикъл на синтеза на мястото на D-Phe се използва Вос-D-нафтилаланин (Bachem Inc., Torrance, Calif.). D-Cha-Хирулог-8 се получава по подобен начин, като се използва Вос-D-циклохексилаланин (Bachem Biosciences, Philadelphia, Pa) в последната стъпка на синтеза.

Двата пептида, заместени в позиция 1, се пречистват, както е описано за Хирулог-8 в пример 2. Пречистените пептиди се характеризират чрез аминокиселинен анализ и чрез FAB-MS.

Пример 5. Синтез на производни на Хирулог, заместени в позиция 2.

Замествания в позиция 2 се проектират по формулата: (D-Cha)-X-Arg-HPro-(Gly)-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu или (D-Cha)-X-Arg-HPro-(Gly)-Asn-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu, в която X е хистидин, тиопролин или изонипекотинова киселина. Тези пептиди се синтезират по същество, както е описано в примери 2 и 4, с изключение на включването на Вос-L-хидроксипролин (Bachem, Inc.) вместо Вос-L-пролин в цикъл 16 на синтеза и на Вос-N-im-CBZ-L-хистидин, Вос-L-тиопролин или Вос-изонипекотинова киселина (всички получени от Bachem, Inc.) вместо Вос-L-пролин в цикъл 18. В позиция 4 се използва HPro, за да се забави скоростта на разкъсване на инхибитора от тромбина. Пептидите се пречистват и характеризират, както е описано в пример 2.

Пример 6. Характеризиране на антиромбиновите активности на заместените в позиция 1 Хирулози.

В тест се сравнява инхибирането на катализираната от тромбина хидролиза на Спектрозим ТН (тозил-Gly-Pro-Arg-p-нитроанилид; American Diagnostica, New York, N.Y.) от Хирулог-8, D-Cha-Хирулог-8 и D-Npa-Хирулог-8. По-конкретно се измерват началните скорости в присъствието или отсъствието на всеки инхибитор в граници на субстратните концентрации от 2,2 до 22 μM . Тромбин-катализираната скорост се отчита в спектрофотометър Cary 19 при 405 nm и се регистрира като непрекъсната функция от времето. Кинетиките се провеждат на стайна температура ($25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$) в 0,05M натриево-боратен буфер, pH 8,4, съдържащ 0,1M NaCl.

В типична ензимна реакция в двете кювети, на пробата и на контролата, се приба-

вя по 1,0 ml буфер. Към кюветата с пробата преди добавянето на Спектрозим ТН (2,2-22 μM) се прибавят тромбин ($3,2 \times 10^{-9}\text{M}$ крайна концентрация) и хирулог ($0-4 \times 10^{-8}\text{M}$). Непосредствено след прибавянето на субстрата, съдържимото в пробните кювети се смесва чрез използване на пластична пипета. Реакцията се отчита спектрофотометрично за 5-15 min.

Началните скорости за всяка субстратна концентрация се изразяват като молове хидролизиран Спектрозим ТН/s/mol тромбин. Те се определят по време на началната линейна фаза на реакцията ($\leq 15\%$ от тоталната хидролиза на субстрата) чрез измерване наклона на хидролитичната реакция. Построяват се съответно графиките на Lineweaver-Burke чрез нанасяне на реципрочната стойност от началната скорост като функция от реципрочната стойност на субстратната концентрация. Подолу са показани константите на инхибиране, получени за Хирулог-8 и производни на настоящото изобретение.

Производно	K_i , nM
Хирулог-8	1,4
D-Cha-Хирулог-8	0,12
D-Npa-Хирулог-8	4,3

Както може да се види от тези резултати, заместването на D-Phe в Хирулог-8 с D-Cha води до изненадващо и неочаквано понижаване на K_i с един порядък. Това откритие показва, че заместването на D-Phe с D-Cha повишава афинитета на свързване на CSDM в инхибиторите на това изобретение. Отказът на D-Npa-Хирулог-8 да понижи K_i посочва, че наличието на наситена пръстенна структура в тази позиция причинява повишения афинитет на свързване. D-Cha съдържа такъв наситен пръстен, докато D-Npa съдържа ненаситен пръстен.

Молекули, съдържащи в позиция 2 субституциите, описани в пример 5, ще проявяват подобни неочаквани понижавания на K_i .

Пример 7. Антикоагулантна активност на A_1 -заместените Хирулози.

Сравняват се антикоагулантната активност на Tug₆₃-O-сулфат-N-ацетил-хирудин₆₃ ("хируген"), рекомбинантен хирудин (American Diagnostica), Хирулог-8 и заместените в позиция 1 хирулози на настоящото изобретение, като се използват обединена нормална човешка плазма (George King Biomedical, Overland Park, Kans.) и апарата Coag-A-Mate XC

(General Diagnostics, Organon Technica, Oklahoma City, Okla.). Активността се отчита чрез използване на теста на активирания частичен тромбопластиново време (АРТТ) с CaCl_2 и фосфолипидни разтвори, получени от производителя. Рекombинантен хирудин (American Diagnostica), Хирулог-8, D-Cha-Хирулог-8 или хируген след това се добавят към гнездата за определяне на АРТТ до крайни концентрации от 10 до 32 300 ng/ml в тотален обем 25 μl преди прибавяне на 100 μl от плазмата.

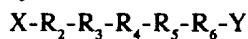
Както е показано на фиг.3, D-Cha-Хирулог-8 удължава АРТТ до 470 % от контролните стойности при концентрация 1 mg/ μl . Това покачване е значително по-голямо, отколкото повишаването на АРТТ, причинено от хируген, рекombинантен хирудин и Хирулог-8 при същата концентрация. И така, в допълнение към показаната повишена антитромбинова активност *in vitro* спрямо Хирулог-8, D-Cha-Хирулог-8 показва също значително повишен антикоагулантен ефект в плазмените тестове по отношение на Хирулог-8.

Молекулите, съдържащи субституциите в позиция 2, описани в пример 5, ще показват покачвания на АРТТ, които са по-големи, отколкото Хирулог-8.

Тъй като дотук са представени редица приложения на изобретението, очевидно е, че основната конструкция може да се променя, с цел обезпечаване на други приложения, в които се използват описаните молекули, препарати, комбинирани препарати и методи.

Патентни претенции

1. Тромбинов инхибитор, насочен към каталитичното място, който се характеризира с формулата:



в която X е HN; R_1 е циклохексил; R_2 е CH_2-CH ; R_3 е $\text{C}=\text{O}$; R_4 е Pro или всяка аминокиселина,

включваща група в страничната верига, която се характеризира с капацитета да приема водородна връзка при pH между 5,5, и 9,5; R_5 е всяка L-аминокиселина, която включва гуанидин- или аминосъдържаща група в страничната верига; R_6 е неамидна връзка, която забавя или възпрепятства разкъсването на инхибитора от тромбина; и Y се избира от групата, състояща се от саркозин, N-метилаланин, хидроксипролин и всяка природна L- α аминокиселина; и аминокиселината, дефинирана от компоненти X, R_1 , R_2 и R_3 е в D-конфигурация.

2. Тромбинов инхибитор съгласно претенция 1, който има последователността от аминокиселини:



3. Тромбинов инхибитор, съгласно претенция 1, при който R_4 се избира от групата, състояща се от хистидин, тиопролин и изонипекотинова киселина.

4. Тромбинов инхибитор, съгласно претенция 1, при който инхибиторът е белязан с радиоизотоп.

5. Препарат за сцинтиграфия на фибринов или тромбоцитен тромб в пациент, характеризиращ се с това, че включва фармацевтично приемлив буфер и тромбинов инхибитор, съгласно претенция 4.

6. Метод за сцинтиграфия на фибринов или тромбоцитен тромб в пациент, характеризиращ се с това, че включва етапите на:

а) въвеждане в пациента на препарат, съгласно претенция 5; и

б) използване на *ex vivo* детектиращи способности за наблюдаване на тромбиновия инхибитор, присъстващ в препарата.

7. Метод съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че се прилага при хора.

8. Тромбинов инхибитор съгласно претенция 4, при който радиоизотопът се избира от групата, състояща се от ^{123}I , ^{125}I и ^{111}In .

Приложение: 3 фигури

Издание на Патентното ведомство на Република България

1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

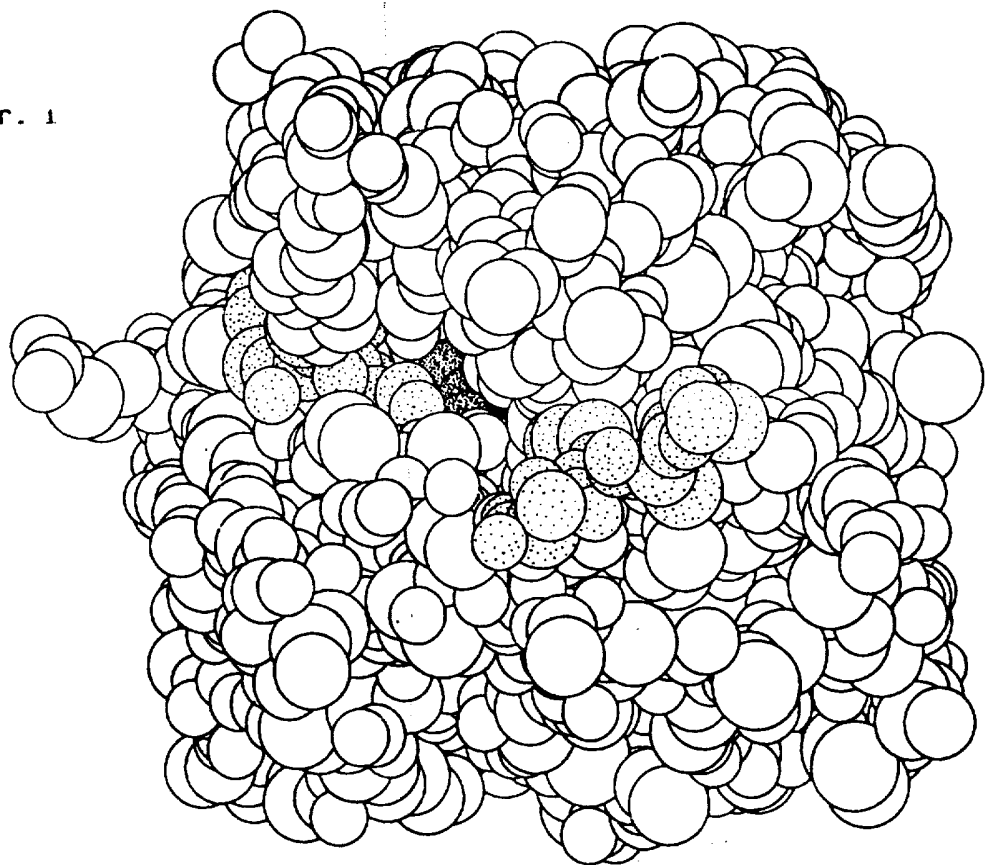
Експерт: Е.Калайджиева

Редактор: Е.Синкова

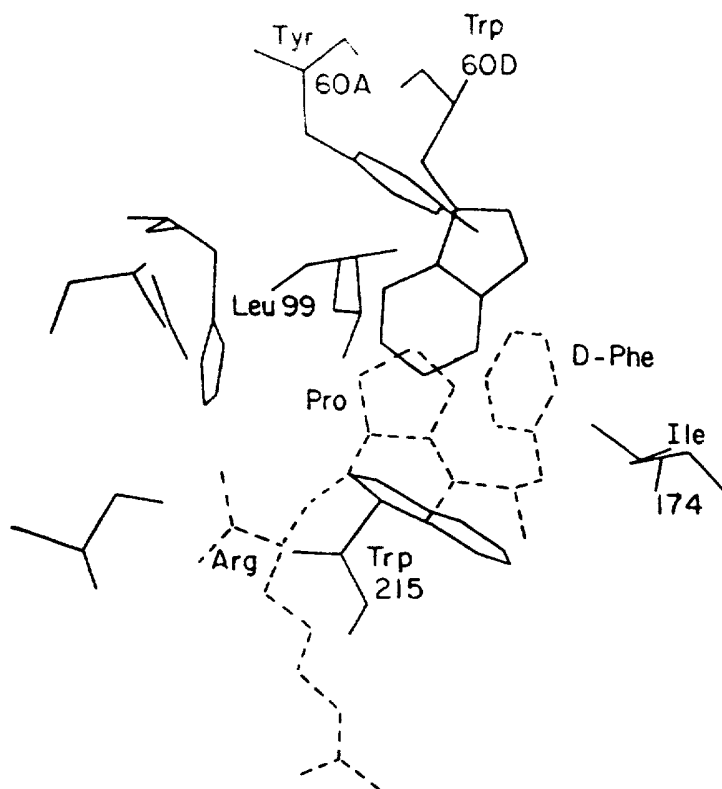
Пор. № 38941

Тираж: 40 MB

Ф И Г. 1



61670



• и г. 2

