

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 851521 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 851521

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁵)
C07K 7/10
A61K 37/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 16.04.1985

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 16.04.1985

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 19.10.1985

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

18.04.1984 DE P_3414593.1 19.10.1984 DE P_3438296.8

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Hoechst Aktiengesellschaft, 65926 Frankfurt am Main, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Tripier, Dominique, Eppstein/Taunus, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Uusia polypeptidejä, joilla on veren hyytymistä estävä vaikutus, menetelmä niiden valmistamiseksi tai talteenottamiseksi, niiden käyttö ja niitä sisältäviä aineita.

Nya polypeptider med blodkoagulering hämmande verkan, förfarande för deras framställning eller utvinning, deras användning och dessa innehållande medel.

Uusia polypeptidejä, joilla on veren hyytymistä estävä vaikutus, menetelmä niiden valmistamiseksi tai talteenottamiseksi, niiden käyttö ja niitä sisältäviä aineita

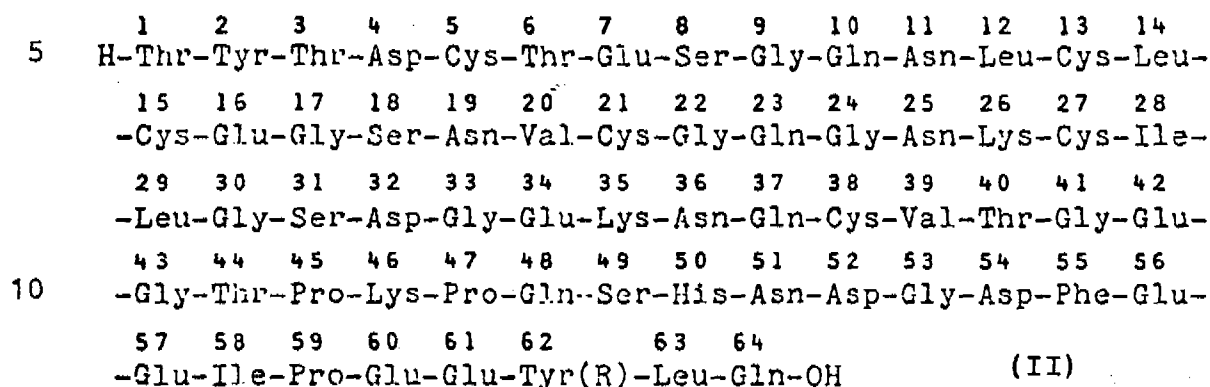
- 5 Hyytymisen estoaineita käytetään trombo-embolisten prosessien ehkäisyyn ja hoitoon; niiden pääkäyttöalue on tällöin ennenkaikkea laskimoveritukkotulppaumuissa. Hyytymisen estoaineita tarvitaan edelleen verisäilykkeiden valmistuksessa. 4-hydroksikumariinin tai 1,4-indaanidiolien johdannaisilla, joita esimerkiksi käytetään tähän tarkoitukseen, on laajalle ulottuvasta optimoinnista huolimatta joukko haittoja (vrt. esim. Mutschler, Arzneimittelnwirkungen, 4. painos, Stuttgart 1981, sivu 375-).

- 15 Sen tähden on toivottavaa, että erityisesti ihmislääketieteessä, on käytettävissä veren hyytymistä estäviä aineita, joilla on vähäinen myrkyllisyys ja vähän sivuvaikutuksia ja jotka aineenvaihduntansa kautta eivät muodosta rasitusta sairastuneelle organismille.

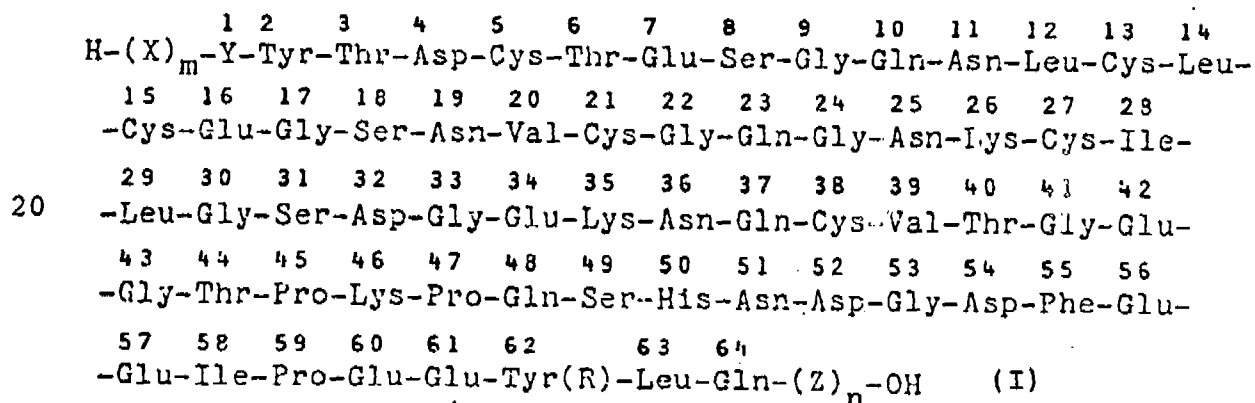
- 20 Paitsi kehon omilla plasmaattisilla estoaineilla kuten Antitrombiini III:lla on myös monilla muilla proteiineilla veren hyytymistä estävä vaikutus, kuten esim. Kunitz-inhibiittorilla, jota saadaan soijapavuista. Tämä estoaine katkaisee veren hyytymistapahtuman estämällä aktivoitua tekijää Xa, mutta tämän inhibiittorin spesifisyys on niin
25 pieni, että syntyy monia sivuvaikutuksia; plasmakallikreinin, plasmiinin, trypsiinin estyminen, niin että terapeutiset käyttötarkoitukset ovat poissuljetut. Myöskään muilla vaikutusaineilla, kuten Ascaris- tai Kazals-inhibiittoreilla ei puuttuvan spesifisyyden takia ole merkitystä.

- 30 Hirudiinilla (The Merck Index, 9. painos, Rahway 1976, sivu 618; Pharmazie 36 (1981) n:o 10), eräällä Hirudo medicinalis-lajista saadulla polypeptidillä on sen sijaan spesifinen antitrombiini-vaikutus (vrt. esim. Markwardt, Blutgerinnungshemmende Wirkstoffe aus blutaugenden Tieren, Jena 1963). Työläs menetelmä sen eristämiseksi ja puhdistamiseksi on tähän asti vaikuttanut epäedullisesti sen käytännön käyttöön.

Nyt keksittiin yllättäen, että iilimadoista voidaan eristää erittäin aktiivista polypeptidiä, jolla on kaava II, jossa R on vety tai SO_3H .



Keksinnön kohteena on siten polypeptidejä, joilla
 15 on kaava I



25

jossa m = 0-50; n = 0-100; R on fenoli-vety tai fenoli-
 esteriryhmä; X tarkoittaa luonnossa esiintyvien α -amino-
 happojen samanlaisia tai erilaisia tähteitä; Y on Val, Ile,
 Thr, Leu tai Phe; ja Z tarkoittaa luonnossa esiintyvien

30 α -aminohappojen samanlaisia tai erilaisia tähteitä ja
 jossa kulloinkin 2 6:sta Cys-tähteestä asemissa 5, 13, 15,
 21, 27 ja 38 on kytkeytynyt disulfidi-silloilla, sekä nii-
 den fysiologisesti siedettäviä suoloja, lukuunottamatta
 polypeptidiä, jolla on kaava I, jossa H-(X)_m-Y on H-Val-Val
 35 ja n = 0.

Luonnossa esiintyviä α -aminohappoja ovat erityisesti

Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Arg, Lys, Hyl, Orn, Cit, Tyr, Phe, Trp, His, Pro ja Hyp.

R on edullisesti vety, SO_3H tai PO_3H_2 , Y on edullisesti Thr ja m ja n ovat edullisesti molemmat 0.

- 5 Edullisia merkityksiä X:lle ja Z:lle ovat Ala, Ile, Val, Tyr tai Phe.

Suoloina tulevat kysymykseen erityisesti alkali- ja maa-alkalimetallisuolat, suolat fysiologisesti siedettävien amiinien kanssa sekä suolat fysiologisesti siedettävien
10 happojen, kuten HCl :n, H_2SO_4 :n, maleiinihapon tai etikka-hapon kanssa.

Keksinnön kohteena on myös biologisesti aktiivisia peptidipilkontatuotteita, joita saadaan näiden polypeptidien kemiallisella tai entsymaattisella pilkonnalla.

- 15 Keksinnön kohteena on edelleen menetelmä puhdistetun polypeptidin, jolla on edellä mainittu kaava, saamiseksi, joka menetelmä on tunnettu siitä, että polypeptidi Annelida-heimon madoista eristetään uuttomenetelmien, saostusmenetelmien, membraanisuodatuksen ja/tai kromatografisten menetelmien yhdistelmän avulla ja saatu peptidi mahdollisesti muu-
20 tetaan fysiologisesti siedettäväksi suoloikseen.

Tätä polypeptidiä saadaan edullisesti Hirudinea-ryhmän madoista, erityisesti Gnathobdellida-lahkon madoista. Edullisia ovat suvut Hirudo ja Haemodipsa. Erityisen edulli-
25 nen on Hirudo-suku ja siitä varsinkin Hirudo medicinalis. Iilimadon kaulan imusolmukkeen ohella voidaan käyttää myös sen kehon etuosaa tai koko iilimatoa.

Eräs menetelmää raakauutteen saamiseksi iilimadoista on selostettu julkaisussa Enzymology, nide 5 "Hirudin as an
30 Inhibitor of Thrombin". Puhdistusmenetelmä Hirudin'ille tunnetaan julkaisusta Bull. Soc. Chim. Biol. 45 (1963) 55.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä on erityisesti osoittautunut hyödylliseksi saostusmenetelmien ja geeli-läpäisy-kromatografian tai ultrasuodatuksen ja tarkkaan
35 erottelevan jakokromatografian "Reverse-Phase"-aineksella ja kromatografian piihappogeelillä tai alumiinioksidilla yhdis-

telmä. Raakauutteen laadun mukaan voidaan edullisesti käyttää kuitenkin myös muita kromatografia-menetelmiä (mahdollisesti myös yhdistelmänä edellä mainittujen menetelmien kanssa), kuten esim. kationin- tai anioninvaihtokromatografiaa, kromatografiaa ei-spesifisillä absorboivilla aineilla, erityisesti hydroksyyliipatiitilla.

Esimerkiksi kromatografiaa varten sopivan raakauutteen saamiseksi voidaan iilimadon pään osat hienontaa pakastetussa tilassa ja uuttaa vesipitoisella puskuriliuoksella (esim. fosfaatti-puskurilla). Liukenematon aines erotetaan esim. linkoamalla lyhyesti tai suodattamalla harsokankaan läpi ja polypeptidi erotetaan ja eristetään näin saadusta utteesta. On edullista kuumentaa tämä uute nopeasti 70-90°C:seen, koska täten proteolyyttisten entsyymien pääosa denaturoituu ja saostuu, ja niiden erottaminen voi siten tapahtua esimerkiksi linkoamalla. Utteesta eristetään proteiini-jae, joka sisältää keksinnön mukaisen peptidin, esim. saostamalla sillä tavalla, että uute lisätään veden kanssa sekoittuvaan orgaaniseen liuottimeen. Esim. asetonia voidaan käyttää moninkertainen määrä, edullisesti n. 10-kertainen määrä utteeseen nähden, jolloin saostaminen suoritetaan kylmässä, tavallisesti 0 - -40°C:ssa, edullisesti n. -20°C:ssa.

Tästä raakauutteesta voidaan suurempimolekyylipainoiset proteiinit erottaa esim. ultrasuodatuksella tai geelilämpäisykromatografialla. Suuremmilla panoksilla voi ultrasuodattaminen tapahtua esim. kahdessa vaiheessa: ensimmäisessä vaiheessa työskennellään kapillaarimembraanilla, jonka erotusraja on 500 000 daltonia ja sitten toisessa vaiheessa hienomembraanilla, jonka erotusraja on 10 000 daltonia. Kapillaarimembraanin avulla päästään suurempimolekyyllisen aineksen nopeaan erottamiseen, joka estäisi selektiivisesti toimivan hienomembraanin läpivirtausta. Pienillä määrillä voidaan luopua myös ensimmäisen vaiheen ultrasuodatuksesta.

Eräs toinen mahdollisuus saostamisen suorittamiseksi on lisätä suoloja, kuten esim. ammoniumsulfaattia. pH-ohjauksella saostaminen saavuttaa tietyn selektiivisyyden. Keksin-

nön mukaista peptidiä, jonka isoelektrinen piste on 3,9, voidaan pH-alueella väliltä 3-5, edullisesti n. 4:ssä, ammoniumsulfaattia lisäämällä saostaa n. 50 %:n pitoisuuteen asti, jolloin joukko mukana seuraavia proteiineja tällöin
 5 jää liuokseen. Myös tämä saostaminen suoritetaan jäähdytyksen alaisena n. -5 - +15°C:ssä, edullisesti välillä 0 - +4°C.

Näin saatu aines koostuu tähän asti käytetystä menetelmästä johtuen yhä vielä polypeptidien seoksesta. Eräs edullinen menetelmä kaavan II, jossa R=H tai SO₃H, inhibiit-
 10 torin saamiseksi perustuu siihen, että raakauutetta fraktionoidaan yhden tai useamman tarkkaan erottelevan kromatografiasysteemin läpi. Tämä jae voidaan sitten puolestaan toisella tarkkaan erottelevalla kromatografiasysteemillä jakaa yksittäisiksi komponenteiksi ja siten eristää kaavan II inhibiit-
 15 torit.

Edullisiksi ensimmäisenä kromatografisena vaiheena näiden inhibiittoreiden talteenotossa ovat osoittautuneet menetelmät, jollaisia tunnetaan esim. EP-A-82359:stä. Tällöin proteiiniseokset erotetaan tavanomaisella pihappogeeli-
 20 lillä, jolla on sopiva osaskoko, tai pihappogeeli-valmispylväillä (kuten esim. Lobar^R-pylväällä) puskurisysteemin avulla.

Näytteen vieminen pylvääseen voidaan suorittaa esitasapainotetulla pylväällä. Ilman haittaa voidaan ainesseos
 25 kuitenkin tuoda myös kuivaan pylvääseen.

Proteiiniseoksen ja absorboivien aineiden välinen suhde 1:50 - 1:200 on osoittautunut edulliseksi.

Eluointi voi tapahtua puskurilla, jossa on kloroformia, metanolia, jääetikkaa, vettä ja trietyyliamiinia.
 30 Tähän voidaan kuitenkin käyttää myös muita puskuriliuoksia, kuten esim. 70 % etanolia, 30 % Tris-puskuria (0,05 M, pH 8,0).

Viimeinen puhdistusvaihe käsittää kromatografisen erotuksen "Reverse-Phase"-aineksella. HPLC-teknologian suuren
 35 erottelukyvyn ansiosta vrt. esim. "High Performance Liquid Chromatography Advances and Perspectives", nide 3, Csaba

Horv  th, Academic Press, 1983, sivut 50-83 tai "Methods of Enzymology", nide 91, sivut 137-190 ja 352-359, 1983 on mahdollista erottaa kaavan II inhibiittorit my  t  seuraavista proteiineista ja valmistaa puhtaana.

- 5 Paikallaanpysyv    faasia varten ovat derivatisoidut p  ihappogeelit, joilla on sopiva osaskoko (esim. välillä 3-20 μ m) osoittautuneet edullisiksi. P  ihappogeelin derivatisointiin sopivat tunnettujen oktadekyyilisilaanit  hteiden ohella myös joukko muita silaanit  hteit   tai niiden seokset,
- 10 kuten silaanit  hteet alemman alkyylin, fenyylialkyyli- tai aminosubstituoidun alkyylin kanssa, jolloin viimeainitut tarjoavat ioninvaihto- ja "Reverse-Phase"-kromatografian tietyn yhdistelmän. Voidaan k  ytt    erotuspylv  it  , joiden pituus on esimerkiksi 5-25 cm ja l  pimitt   3-10 mm. Puskuroi-
- 15 tuna eluoimisaineena tulevat kysymykseen kaikki sekundaariset tai tertiaariset seokset veden ja orgaanisten liuottimien, joilla on sopiva lipofiiliys, kuten esim. alempien alkoholien, ketonien, nitrili  n, eettereiden, happojen, amiinien, glykolieettereiden, amidien ja niiden johdannaisten välillä.
- 20 Puskurina voidaan k  ytt    orgaanisia ja epäorgaanisia suoloja tai muunkaltaisia lisäyksiä. Eluointi tapahtuu edullisesti pH-arvossa välillä 2-8.

Haihtuvien puskuriaineiden, kuten ammoniumasetaatin tai ammoniumbikarbonaatin käyttö tekee mahdolliseksi inhi-

25 biittorien talteenoton eluaatista yksinkertaisella pakaste-kuivauksella.

Keksinnön mukainen kaavan II polypeptidi on väritön, liukoinen veteen ja vesipitoisiin puskureihin, se on homogeninen polyakryyliamidi-elektroforeesissa ja sen isoelektri-

30 nen piste on 3,9 (määritettynä isoelektrisell   fokusoinnilla). Jos aminohappokoostumus määritetään Moore'n ja Stein'in menetelmällä (Methods of Enzymology nide VI, 819-831, toimittaneet Rolovick ja Kaplan, Academic Press, New York, Lontoo, 1963), havaitaan seuraavat arvot: 9 aspargiini-

35 happoa, 5 treoniinia, 4 seriiniä, 13 glutamiinihappoa, 3 proliinia, 9 glysiiniä, 2 valiinia, 6 systeini  , 2 isoleusiini-

nia, 4 leusiinia, 2 tyrosiinia, 1 fenyylialaniini, 3 lysiiniä ja 1 histidiini.

Edelleen on keksinnön kohteena menetelmä edellä mainitun kaavan I polypeptidin valmistamiseksi, joka menetelmä
5 on tunnettu siitä, että

a) se valmistetaan sinänsä tunnetulla tavalla kiinto-faasisynteesillä tai

b) polypeptidin valmistamiseksi, jossa $n = 0$,

I. hirudiini saatetaan kaksinkertaiseen Edman-hajo-
10 tukseen,

II. näin saatu peptidi saatetaan reagoimaan aminos-
hapon tai peptidin, jolla on kaava $U-(X)_m-Y-OH$, jossa m , X
ja Y tarkoittavat samaa kuin edellä ja U on happo- tai emäs-
labiili uretaani-suojaryhmä, aktiiviesterin kanssa,

15 III. fenyyliitiokarbamoyyliryhmä Lys:n ϵ -aminofunk-
tiolla lohkaistaan hydratsiinin avulla

IV. ja uretaanisuojaryhmä U lohkaistaan hapon tai
emäksen avulla ja a): n tai b): n mukaisesti saatu polypeptidi
mahdollisesti muutetaan fysiologisesti siedettäväksi suo-
20 lakseen.

Kiinto-faasisynteesissä (vrt. tätä varten Atherton,
Sheppard, Perspectives in Peptide Chemistry, Karger Basel
1981, sivut 101-117) voidaan yleensä luopua OH-suojaryh-
mästä Thr:lle.

25 Kaavan I polypeptidin synteesi tapahtuu esim. vaiheit-
tain hydroksimetyloidulla polystyreenihartsilla. Polystyree-
ni on verkkoutettu poikittain esimerkiksi 1 %:lla divinyyli-
bentseeniä. Se on tavallisesti pienten pallosten muodossa.

Aminohappoja käytetään N-päätesuojattuina. Ensimmäinen N-suojattu aminohappo tuodaan esterin muodostuksella
30 kantimelle. Aminosuojaryhmän poistamisen jälkeen liitetään
seuraava N-suojattu aminohappo käyttäen kytkentäreagenssia,
kuten disykloheksyylikarbodi-imidiä. Muiden aminohappojen
suojauksen poistamista ja liittämistä jatketaan kunnes halut-
35 tu sekvenssi saavutetaan.

Suojaryhmien valinta määräytyy aminohappojen ja kyt-
kentämenetelmien mukaan.

Aminosuojaryhminä tulevat kysymykseen esim. tunnetut uretaani-suojaryhmät kuten bentsyylioksikarbonyyli(Z), p-metoksikarbobentsoksi, p-nitrokarbobentsoksi, t-butyylisokarbonyyli(Boc), F-moc yms.

- 5 Boc-ryhmä on edullinen, koska se on lohkaistavissa pois suhteellisen miedoilla hapoilla (esim. trifluorietikka-hapolla tai HCl:lla orgaanisissa liuottimissa).

- Treoniini voidaan suojata bentsyylietterinä ja ly-siinin ϵ -aminofunktion Z-johdannaisena. Nämä molemmat suo-
10 jaryhmät ovat pitkälti kestäviä lohkaisureagensseja vastaan Boc-ryhmälle ja voidaan poistaa hydraamalla hydrauskatalyytin (Pd/aktiivihiilen) kanssa tai esim. natriumilla neste-mäisessä ammoniakissa.

- Suojattu peptidi voidaan erottaa hartsista esim.
15 hydratsiinilla. Tällöin syntyy hydratsidi, joka voidaan muutta-
taa esim. N-bromisukkiini-imidillä julkaisun Int. J. Pept.
Prot. Research 17 (1981) 6-11 mukaisesti vapaaksi karboksyy-
lihapoksi. Jos on tarpeen, täytyy disulfidi-sillat tukkia
hapettavasti (vrt. König, Geiger, Perspectives in Peptide
20 Chemistry, Karger Basel, sivut 31-44).

- Menetelmämuunnoksessa b) hirudiini saatetaan kaksin-
kertaiseen Edman-hajotukseen siten, että tämä polypeptidi
saatetaan sopivassa puskuriliuoksessa, kuten pyridiini/ve-
dessä tai dioksaani/vedessä mahdollisesti emästä, kuten NaOH
25 tai trietyyliamiinia lisäämällä, edullisesti n. 40°C:ssa ja
pH:ssa 8-9 reagoimaan isotiosyanaatin, edullisesti fenyyli-
isotiosyanaatin kanssa. Käsittelemällä hapolla (esim. 3N HCl
huoneen lämpötilassa ja sen jälkeen lämmittämällä 40°C:ssa)
N-pääte-valiini lohkaistaan fenyyliitiatsolinonina. Tämä reak-
30 tiosarja toistetaan toisen N-päätteellä olevan valiinin loh-
kaisemiseksi.

- Tällä tavalla saatu Des-(Val)₂-hirudiini-johdannainen
saatetaan reagoimaan jonkin aminohapon tai peptidin, jolla on
kaava U-(X)_m-Y-OH, aktiiviesterin kanssa. Sopivia ovat esim.
35 p-nitrofenyyli-, syanimetyyli-, N-hydroksiftaali-imidi- tai
erityisesti N-hydroksisukkiini-imidi-esteri. Sopivia uretaani-

suojaryhmiä U ovat sellaiset, jotka voidaan lohkaista happamesti tai alkalisesti, kuten esim. Boc tai Msc. Jos on tarpeen, voidaan myös mahdollisesti läsnäolevia funktioita X:n ja Y:n sivuketjuissa tilapäisesti suojata sopivilla suojar

5 ryhmillä.

Kaavan I ($n = 0$) polypeptidin tällä tavalla saatua suojattua esivaihetta käsitellään lysiinillä olevan fenyyli-tiokarbamoyyliryhmän lohkaistamiseksi sopivassa liuottimessa, kuten alemmassa alkoholissa tai sen seoksessa veden kanssa,

10 hydratsiini-hydraatilla.

Tästä polypeptidistä lohkaistaan nyt vielä jäljellä oleva suojaryhmä (jäljellä olevat suojaryhmät) sopivalla tavalla (Boc esim. trifluorietikkahapolla, Msc emäksellä) ja saadaan siten kaavan I keksinnön mukainen polypeptidi.

15 Keksinnön mukaiset polypeptidit ovat trombiinin spesifisiä stökiometrisiä estäjiä. Trombiini-estymisen keksinnön mukaisten inhibiittorien vaikutuksesta kvantitatiivinen mittaus osoitti, että kompleksi inhibiittori-trombiini ei käytännöllisesti dissosioitu. Tämän mittausmenetelmän avulla

20 voidaan valmiiksikäsittelyn ja puhdistamisen aikana keksinnön mukaisten polypeptidien aktiivisuus ja siten puhtausaste määrittää. Edellä mainitun kaavan II näin puhdistetun polypeptidin trombiini-esto voi tällöin olla yli 10 000 ATU/mg ja olla siten suurempi kuin tavallisella hirudiinilla.

25 Keksinnön kohteena on siten myös polypeptidien, joilla on kaava I, jossa m, n, R, X, Y ja Z tarkoittavat samaa kuin edellä ja Y voi lisäksi tarkoittaa myös kemiallista sidosta, käyttö veren hyytymisen estoaineena käytettäväksi trombo-embolisten prosessien hoidossa, sekä niiden

30 käyttö taudinmääritysaineena ja reagensseina.

Vielä on keksinnön kohteena aineita, jotka sisältävät kaavan I polypeptidiä farmaseuttisesti vaarattomassa kanti-messa, sekä menetelmiä niiden valmistamiseksi, jotka ovat tunnettuja siitä, että nämä saatetaan sopivaan antomuotoon.

35 Keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan antaa ruoansulatuskanavan ulkopuolisesti tai ulkonaisesti vastaavassa farmaseuttisessa valmisteessa.

Ihonalaista tai laskimonsisäistä käyttöä varten saate-
 taan aktiiviset yhdisteet tai niiden fysiologisesti siedet-
 tävät suolat, haluttaessa sitä varten tavallisten aineiden
 kuten liuotusvälitysaineiden, emulgaattorien, isotooniseksi
 5 tekevien aineiden, säilöntäaineiden tai muiden apuaineiden
 kanssa, liuokseen, suspensioon tai emulsioon. Liuottimina
 näitä uusia aktiivisia yhdisteitä ja vastaavia fysiologisesti
 siedettäviä suoloja varten tulevat kysymykseen esim.: vesi,
 fysiologiset keittosuolaliuokset tai alkoholit, esim. eta-
 10 noli, propaanidioli tai glyseriini, niiden ohella myös soke-
 riliuokset kuten glukooosi- tai manniitti-liuokset tai myös
 näiden mainittujen eri liuottimien seos.

Ulkonaisesti käytettävät kantoaineet voivat olla
 orgaanisia tai epäorgaanisia yhdisteitä. Tyypillisiä farma-
 15 seuttisia käytettyjä kantoaineita ovat vesipitoiset liuokset,
 jotka ovat esimerkiksi puskurisysteemejä tai veden ja veden
 kanssa sekoittuvien liuottimien, kuten esim. alkoholien tai
 aryylialkoholien isotoonisia seoksia, öljyt, polyalkyleeni-
 glykolit, etyyliiselluloosa, karboksimeetyyliiselluloosa, poly-
 20 vinyylipyrrolidoni tai isopropyylimyristaatti. Sopivia pus-
 kureita ovat esim. natriumboraatti, natriumfosfaatti, nat-
 riumasettaatti tai myös glukonaatti-puskuri. Ulkonaisesti
 käytettävä muoto voi sisältää myös ei-myrkyllisiä apuainei-
 ta, kuten esim. emulgoivia säilöntäaineita, silloitusaaineita,
 25 kuten esim. polyetyleeniglykoleja ja bakteerinvastaisia
 yhdisteitä.

Esimerkki 1

Inhibiittori-väkevyyden määrittäminen trombiini- titrauksella

30 10-100_{ul} inhibiittori-liuosta, jolla on ennalta
 määrätty proteiinipitoisuus, sekoitetaan 200_{ul}:n kanssa
 natriumvetykarbonaatti-liuosta (pH = 7,0 0,5 M). Lisätään
 0,1 ml fibrinogeeni-liuosta (0,5-1 %) tai ohennettua sit-
 raattiplasmaa; säännöllisin välein lisätään, sekoittaen,
 35 huoneen lämpötilassa tasaosa (50-100_{ul}) trombiini-liuosta
 (n. 100 NIH-yksikköä/ml). Muutospisteenä voi puolikvanti-

tatiivisesti työskenneltäessä toimia nesteen hyytyminen valitulla aikavälillä, tai, kvantitatiivisia määrittämiä varten, sameusmittaus 546 nm:ssä.

Esimerkki 2

- 5 Käytetään *Hirudo medicinalis*-lajin vapaasti eläviä iilimatoja (ei viljeltyjä eläimiä), jotka on kerätty Saksassa. Noin 150-200 g pakastettuja iilimatojen etupäitä homogenoidaan sekoittimessa 2 l:n kanssa jääkylmää 0,09-%:sta natriumkloridiliuosta ja 10 ml:n kanssa oktanolia 3 minuut-
- 10 tia. 30-minuuttisen linkoamisen jälkeen 0°C:ssa ja kierrosluvulla 10 000 r/min kirkastetaan päällä olevaa nestettä edelleen suodattamalla kaksikerroksisen harsokankaan läpi ja kuumennetaan sen jälkeen sekoittaen 15 minuuttia 80°C:ssa. Syntynyt saostuma erotetaan suodattamalla neljäkerroksisen
- 15 harsokankaan läpi. Suodos jäädytetään nopeasti 4°C:seen jäähauteella sekoittamalla ja lisätään 7,5 l:aan esijäähdytettyä (-20°C) asetonia. Syntyy uudelleen saostuma, joka 5 minuutin kuluttua suodatetaan lasi-imusuodattimella ja pestään 1 l:lla kylmää (-20°C) asetonia. Tyhjössä kuivaamisen
- 20 jälkeen syntyy 520 mg vaaleankellertävää jauhetta, jonka proteiinipitoisuus on 62 % (määritetty Lowry'n menetelmällä). Antitrombiini-aktiivisuus on n. 400 yksikköä/mg.

Esimerkki 3

- 520 mg esimerkin 1 mukaista jauhetta liuotetaan 75
- 25 ml:aan vettä, asetetaan sitten 5 N ammoniakilla pH 8,0:aan ja sekoitetaan 1 tunti 0-4°C:ssa. Liukenematon osa lingotaan 30 minuutin aikana eroon kuppisentrifugilla kierrosluvulla 5000 r/min. Proteiinipitoisuuden asettamisen jälkeen 25 mg:ksi/ml (Lowry) vettä lisäämällä, liuokseen lisätään 35 ml
- 30 kyllästettyä ammoniumsulfaattiliuosta ja sekoitetaan 1 tunti 4°C:ssa. Ensimmäinen sakka erotetaan nopeasti linkoamalla (5000 r/min/30 min). Tähän liuotetaan vielä n. 26 g ammoniumsulfaattia ja asetetaan pH-arvo jääetikalla pH 4:ään. 5 tunnin seisomisen jälkeen koko suspensio lingotaan ja
- 35 saatua kosteata sakkaa käsitellään edelleen seuraavasti.

Esimerkki 4

Esimerkin 3 mukaisesti saatu kostea sakka liuotetaan 200 ml:aan 0,1 M ammoniumvetykarbonaattiliuosta, jonka pH on 8, ja ultrasuodatetaan 250 ml:n Amicon^R-kennossa, jossa on 5 PM 10-hienomembraani (erotusraja 10 000 daltonia). Tällöin liuos väkevöityy n. 40 ml:ksi, jolloin loppua kohti lisätään kahdesti 150 ml 0,1 ammoniumvetykarbonaattiliuosta, pH 8,0. Jäännöksen pakastekuivaaminen antaa n. 350 mg ainesta, jonka proteiinipitoisuus on 89 %.

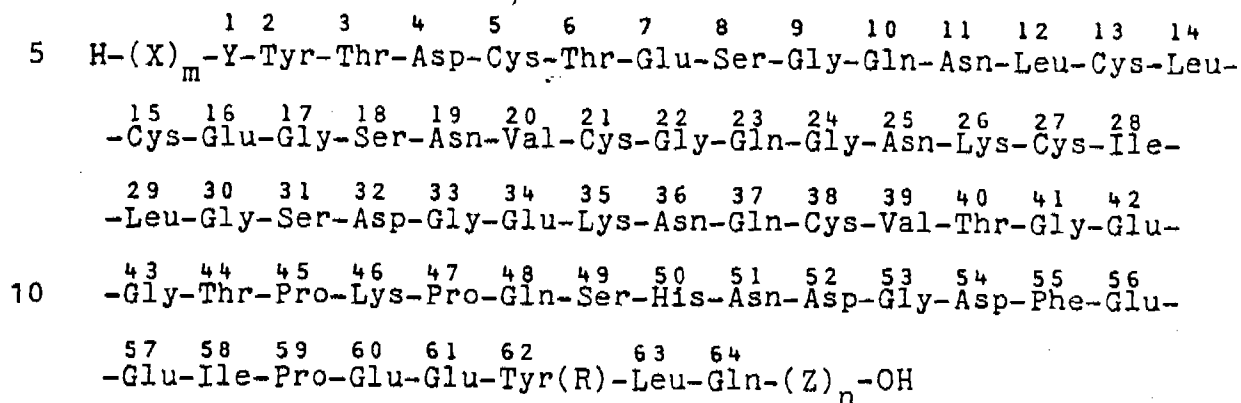
10 C-pylväs (Merck) täytetään täryttäen (Vibromischer) piihappogeelillä, 50 μ m 100 Å (Grace). 500 mg uutetta esimerkistä 4 liuotetaan 5 ml:aan seosta, jossa on kloroformia, metanolia, jääetikkaa, vettä ja trietyyliamiinia tilavuussuhteessa 1200 : 1200 : 4 : 400 : 12 ja viedään 0,2 %:n
15 kanssa ammoniumasetattia pylvääseen. Pylväs eluoidaan samalla seoksella nopeudella n. 4 ml/min ja fraktionoidaan 5-10 ml:n annoksiksi. Eluaatin kuivaamisen jälkeen inhibiittoria sisältävät jakeet liuotetaan natriumvetykarbonaattiin (pH = 7,0, 0,5 M) ja kootaan. Saanto on n. 50 mg, aktiivisuus 4000 ATU/mg.

Esimerkki 6

20 mg esimerkin 3 mukaista inhibiittoria liuotetaan 200 μ l:aan vettä, pH 2,16 (asetettu trifluorietikkahapolla + 5 %:lla asetonitriiliä) ja ruiskutetaan oktadekyylisilaani-
25 piihappogeelillä (5 μ m) täytetylle teräspylväälle (Shandon^R ODS). Pylvästä eluoidaan korkeintaan 2 %:n/minuutti gradientilla lähtöpuskurin (vesi-pH = 2,16 + 5 % asetonitriiliä) ja loppupuskurin (asetonitriili/vesi pH = 2,16 80/20) välillä. Jakeet kerätään yksittäin. Kuivaamisen jälkeen on kaavan
30 II (R=H tai SO₃H) inhibiittorilla spesifinen aktiivisuus, joka vastaa 1 : 1-kompleksin trombiinin kanssa stökiometriaa.

Patenttivaatimukset

1. Polypeptidi, jolla on kaava I



(I)

- 15 jossa m = 0-50; n = 0-100; ja R on fenoli-vety tai fenoli-
 esteri-ryhmä; X tarkoittaa luonnossa esiintyvien α-amino-
 happojen samanlaisia tai erilaisia tähteitä; Y on Val, Ile,
 Thr, Leu tai Phe; ja Z tarkoittaa luonnossa esiintyvien α-
 aminohappojen samanlaisia tai erilaisia tähteitä; ja
 20 jossa kulloinkin 2 6:sta Cys-tähteestä asemissa 5, 13, 15,
 21, 27 ja 38 on kytkeytynyt disulfidi-silloilla,
 sekä sen fysiologisesti siedettäviä suoloja,
 lukuunottamatta polypeptidiä, jolla on kaava I, jossa
 H-(X)_m-Y on H-Val-Val ja n = 0.

- 25 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, jossa R
 on vety, SO₃H tai PO₃H₂ ja/tai jossa X on Ala, Ile, Val,
 Tyr tai Phe, ja/tai jossa Z on Ala, Ile, Val, Tyr tai Phe
 ja/tai jossa m = 0 ja n = 0.

- 30 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdiste, jossa Y
 on Thr.

4. Iilimadoista saatu polypeptidi, jonka aminohappo-
 koostumus on (Moore'n ja Stein'in menetelmä): 9 asparagiini-
 nihappoa, 5 treoniinia, 4 seriiniä, 13 glutamiinihappoa,
 3 proliinia, 9 glysiiniä, 2 valiinia, 6 systeiniä, 2 iso-
 35 leusiinia, 4 leusiinia, 2 tyrosiiniä, 1 fenyylialaniini,
 3 lysiiniä, 1 histidiini, jolloin yhden tyrosiinitähteistä
 OH-ryhmä voi olla esteröity rikkipapolla.

5. Jonkin patenttivaatimuksen 1-4 mukaisen polypeptidin biologisesti aktiivinen pilkontatuote.

6. Menetelmä patenttivaatimuksen 3 tai vaatimuksen 6 mukaisen puhdistetun polypeptidin saamiseksi, t u n n e t t u
5 siitä, että polypeptidi eristetään lahkoon Gnathobdellida madoista, edullisesti Hirudo-suvun madoista uuttomenetelmien, saostusmenetelmien, membraanisuodatus- ja/tai kromatografisten menetelmien yhdistelmän avulla ja saatu peptidi mahdollisesti muutetaan fysiologisesti siedettäväksi suoloikseen.

10 7. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen polypeptidin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) se valmistetaan sinänsä tunnetulla tavalla kiinto-faasisynteetillä tai

b) polypeptidin valmistamiseksi, jossa $n = 0$,

15 I. hirudiini saatetaan kaksinkertaiseen Edman-hajotukseen,

II. näin saatu peptidi saatetaan reagoimaan aminohapon tai peptidin, jolla on kaava $U-(X)_m-Y-OH$, jossa m , X ja Y tarkoittavat samaa kuin edellä ja U on uretaani-suojaryhmä, aktiiviesterin kanssa,
20

III. fenyyliitiokarbamoyyliryhmä Lys'in ξ -aminofunktiolla lohkaistaan hydratsiinilla

IV. ja uretaanisuojarahmää U lohkaistaan hapon tai emäksen avulla ja a):ssa tai b):ssä saatu polypeptidi mahdollisesti muutetaan fysiologisesti siedettäväksi suolaksi.
25

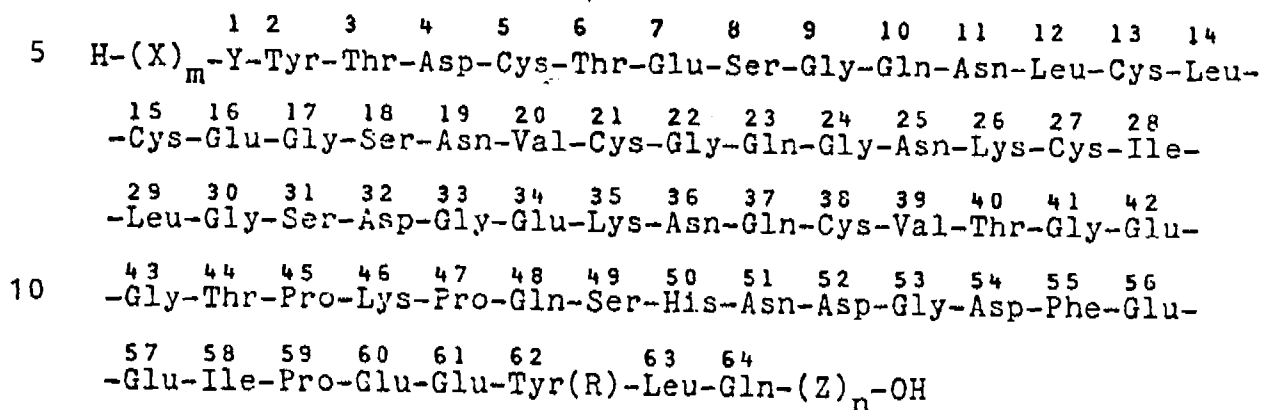
8. Polypeptidi, jolla on kaava I, jossa $m = 0-50$; $n = 0-100$; ja R on fenoli-vety tai fenoliesteriryhmä; X tarkoittaa luonnossa esiintyvien α -aminohappojen samantlaisia tai erilaisia tähteitä; Y on kemiallinen sidos; ja
30 Z tarkoittaa luonnossa esiintyvien α -aminohappojen samantlaisia tai erilaisia tähteitä ja jossa kulloinkin kaksi kuudesta Cys-tähteestä asemissa 5, 13, 15, 21, 27 ja 38 on kytkeytynyt disulfidi-silloilla, sekä sen fysiologisesti siedettävät suolat.

35 9. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 tai 8 mukaisen polypeptidin käyttö reagenssina.

10. Aineita, jotka sisältävät jonkin patenttivaatimuksen 1-5 tai 8 mukaisen polypeptidin ja farmaseuttisesti vaarattoman kantimen.

Patentkrav

1. Polypeptid med formeln I



(I)

15 där $m = 0-50$; $n = 0-100$; och R är ett fenoliskt väte eller en fenolestergrupp; X står för lika eller olika rester av naturligt förekommande α -aminosyror; Y är Val, Ile, Thr, Leu eller Phe; och Z står för lika eller olika rester av naturligt förekommande α -aminosyror och där 2 av de 6 Cys-
 20 resterna i positionerna 5, 13, 15, 21, 27 och 38 är sammankopplade via disulfid-broar, och dess fysiologiskt godtagbara salter, varvid polypeptiden med formeln I, där $\text{H-(X)}_m\text{-Y}$ står för H-Val-Val och n är $= 0$, är utesluten.

2. Förening enligt patentkravet 1, där R är väte,
 25 SO_3H eller PO_3H_2 , och/eller där X är Ala, Ile, Val, Tyr eller Phe, och/eller där Z är Ala, Ile, Val, Tyr eller Phe och/eller där $m = 0$ och $n = 0$.

3. Förening enligt patentkravet 2, där Y är Thr.

4. Ur blodiglar utvunnen polypeptid med aminosyrsammansättningen (metod av Moore och Stein): 9 asparaginsyror, 5 treonin, 4 serin, 13 glutaminsyror, 3 prolin, 9 glycin, 2 valin, 6 cystein, 2 isoleucin, 4 leucin, 2 tyrocin, 1 fenylalanin, 3 lycin, 1 histidin, där OH-gruppen av en av tyrocinresterna kan vara förestrad med svavelsyra.

35 5. Biologiskt aktiv avspjälkningsprodukt av en polypeptid enligt något av patentkraven 1-4.

6. Förfarande för utvinning av en renad polypeptid enligt patentkravet 3 eller 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att polypeptiden isoleras ur maskar av ordningen Gnathobdellida, företrädesvis ur maskar av släktet Hirudo
 5 med hjälp av en kombination av extraktionsmetoder, fällningsmetoder, membranfiltration och/eller kromatografiska förfarande och den erhållna peptiden eventuellt överförs i sina fysiologiskt godtagbara salter.

7. Förfarande för framställning av en polypeptid
 10 enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att
 a) den framställs på ett i och för sig känt sätt medelst fastfassyntes eller
 b) för framställning av en polypeptid, där n är 0,
 I. underkastas hirudin en tvådubbel Edman-nedbrytning,
 15 II. den så erhållna peptiden reageras med en aktiv ester av en aminosyra eller en peptid med formeln $U-(X)_m-Y-OH$, där m, X och Y är som ovan definierats och U står för en uretan-skyddsgrupp,
 III. fenyltiokarbamoyl-gruppen på ϵ -amino-funktionen
 20 av Lys avspjälks medelst hydrazin
 IV. och uretan-skyddsgruppen U avspjälks med hjälp av en syra eller bas och den enligt a) eller b) erhållna peptiden eventuellt överförs i sitt fysiologiskt godtagbart salt.

25 8. Polypeptid med formeln I, där m är = 0-50; n är = 0-100; och R betyder det fenoliska vätet eller en fenol-estergrupp; X står för lika eller olika rester av naturligt förekommande α -aminosyror; Y är en kemisk förening och Z står för lika eller olika rester av naturligt förekommande
 30 α -aminosyror och där två av de 6 Cys-resterna i positionerna 5, 13, 15, 21, 27 och 38 är sammankopplade via disulfidbroar, och dess fysiologiskt godtagbara salter.

9. Användning av en polypeptid enligt något av patentkraven 1-5 eller 8 som reagens.

35 10. Medel som innehåller en polypeptid enligt något av patentkraven 1-5 eller 8 och en farmaceutiskt ofarlig bärare.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansöknin

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI

CH

DE

DK

FR

GB

NO

SE

US

Merkitse hakemusjulkaisuun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisuun numeron K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Febs Letters 165(2) 1984, s. 180-184

Die Pharmazie 36 1981, s. 653-660

Kari Huusikall

Allekirjoitus