(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C07K 7/06

(45) 공고일자 1999년01월15일
(11) 등록번호 특0168644
(24) 등록일자 1998년10월07일

(21) 출원번호 특1990-015755
(22) 출원일자 1990년09월29일
(65) 공개번호 특1991-007959
(43) 공개일자 1991년05월30일

(73) 특허권자 메렐 다우 파마슈티칼스 인크 게리 디. 스트리트
미합중국 45215 오하이오주 신시내티 이스트 갈브레이스 로드 2110
(72) 발명자 죤 레오나드 크르스테난스키
미합중국 45208 오하이오주 신시내티 얼트 파크 3749
시몬 젠 탄 마오
미합중국 45140 오하이오주 러브랜드 켄톤스런 9373
(74) 대리인 김성택, 장수길

심사관 : 손민

(54) 방사성 동위원소로 표지된 항응고성 펩티드

요약

본 발명은 요오드화된 항응고성 펩티드 유도체의 용도에 관한 것이다.

명세서

[발명의 명칭]

방사성 동위 원소로 표지된 항응고성 펩티드

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 방사성 동위 원소로 표지될 수 있는 신규한 항응고성 펩티드에 관한 것이며, 이와 같은 펩티드는 진단용 키트로서 신체내 또는 이들의 적절한 시료내에 존재하는 트롬빈을 검출하는데 유용한 시약이다.

항응고제는 예를 들면 급성 심부 정맥 혈전증, 폐동맥 색전증, 사지의 급성 동맥 색전 형성, 심근 경색, 및 범발성 혈관내 응고의 약리학적 치료에 유용한 치료제이다. 항응고제를 예방적으로 투여하면 류마티스성 질환 또는 동맥경화성 심장 질환 환자에 있어서 색전증의 재발을 방지하며, 수술의 특정 혈전 색전증 합병증을 방지하는 것으로 믿어진다. 또한, 항응고제의 투여는 관동맥 질환 및 뇌 혈관성 질환을 치료하는 것으로 알려져 있다. 동맥 혈전증, 특히 심장 근육 및 뇌의 동맥에서의 혈전증은 사망의 주원인이다.

히루딘은 거머리 타액선으로부터 분리된 65개의 아미노산 잔기로 이루어진 폴리펩티드이다. 이 폴리펩티드는 트롬빈 특이성 억제제이며, 따라서 항응고제로서 사용될 수 있다. 거머리 추출물로부터 분리된 히루딘은 상당한 효능을 가지고 있지만, 양이 제한되고, 가격이 고가이며, 및 이러한 크기의 외부 단백질을 투여할 때 통상적으로 수반되는 알레르기성 반응 때문에, 임상적으로 사용될 가능성은 없는 것으로 여겨 진다.

본 발명자들은 히루딘의 항응고 활성의 적어도 부분적인 원인이 되는 히루딘의 특이 영역을 최초로 발견하였다. 이 펩티드 영역(히루딘의 55 내지 65 아미노산 잔기)을 화학적으로 합성하였으며, 이 영역은 트롬빈의 인식 부위에 결합하는 것으로 밝혀졌으며, 이 인식 부위는 효소 절단 부위와는 공간적으로 분리되어 있다. 합성 펩티드의 결합은, 피브린 생성 및 혈병 형성에 중요한 요건인 트롬빈의 인식 부위에 대한 피브리노겐의 결합을 경쟁적으로 방지하며, 따라서, 항응고제로서 유효한 의학적 가치가 있다.

본 발명자들은 특정 요오도티로신 및 이 펩티드의 방사성 동위 원소로 표지된 티로신 유도체를 제조하였다. 본 발명은 활성이 존재하는 결합 부위를 보존하면서 히루딘 펩티드를 표지화시키는 방법을 제공한다. 본 발명의 요오도티로신 펩티드 및 방사성 동위 원소 유도체는 또한 항응고제로서의 모체 특성을 유지하므로, 과학적으로 흥미가 있고 치료학적으로 중요한 보조제로서 사용되는 것을 가능케 해준다. 특히, 수소 및 요오드의 방사성 동위 원소를 펩티드에 혼입시키고, 이 펩티드의 생물학적 활성을 유지하는 능력은 항응고제에 관한 약학적 시험 및 이용에 있어서 새로운 중요한 시약을 제공한다. 이와 같은 시약은 동물 및 생화학적 연구, 즉 방사면역 분석법, 약물 아고니스트 및 길항제의 선별, 약물동력 학 및 생체분포 연구, 및 진단용 촬영에 중요할 것으로 예상되고 있다. 더우기, 요오도티로신 또는 이들의 방사성 동위 원소의 존재는 항혈전제의 개발 및 시험에 있어서 가치가 있는 것으로 입증될 수 있으며, 이와 같은 유도체는 그 자체로서 향상된 효능 및 장기 활성을 가질 수 있다.

항응고제로서의 다음 일반식의 펩티드 유도체는 진단학적 촬영, 키트 중에서의 진단학적 검출 및 정량화나, 또는 항응고제로서 유용하며, 적어도 1개의 치환체는 방사성 동위 원소를 함유한다.

$X-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-A_{10}-Y$

상기 식에서, X는 수소, 탄소수 1 내지 10의 1 또는 2개의 알킬기, 탄소수 2 내지 10의 1 또는 2개의 아실기, 카르보벤질옥시 또는 t-부틸옥시 카르보닐로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노 말단 잔기이고, A_1은 히루딘 또는 그의 천연 변이체 또는 그의 일부의 서열이거나, 하나의 결합이거나, 또는 1 내지 11개의 임의의 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드이며, A_2는 I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, 또는 L-방향족 아미노산(A_9가 방사성 동위 원소로 표지된 아미노산일 경우)의 0 내지 5개의 잔기이며, A_3은 Glu, Asp, Ala이며, A_4는 임의의 아미노산이며, A_5는 Ile, Val, Leu, Nle, Ala 또는 Phe이며, A_6은 Pro, Hyp, Azt, Pip, DhPro, 티아졸리딘-4-카르복실레이트, Sar, NMePgl 또는 D-Ala이며, A_7은 임의의 아미노산이며, A_8은 임의의 아미노산이며, A_9는 Tyr, I-Tyr, [^{131}I]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{3}H]-Tyr, Met, Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, Cha, His, Ala 및 Pro로 구성되는 군으로부터 선택된 친지성 아미노산이거나, 또는 이러한 아미노산 또는 임의의 친지성 아미노산 중 적어도 1개를 함유하는 디펩티드이며, A_{10}은 히루딘 또는 그의 천연 변이체 또는 그의 일부의 서열이거나, 하나의 결합이거나, 또는 1 내지 11개의 임의의 아미노산 관기를 함유하는 펩티드이며, Y는 OH, (C_1-C_8)알콕시, 아미노, 또는 모노 또는 디(C_1-C_4)알킬 치환 아미노산으로부터 선택된 카르복시 말단 잔기이다.

본 명세서 전반에 걸쳐서 사용된 (1) 아미노산 및 이들의 3문자 코드, (2) 변형된 비정상 아미노산, 및 (3) 말단 아미노 및 카르복시 치환체의 약자를 다음에 요약한다.

(1) : 아미노산 및 이들의 3 문자 코드

L-아미노산	D-아미노산
Ala - 알라닌	D-Ala - D-알라닌
Arg - 아르기닌	D-Arg - D-아르기닌
Asn - 아스파라긴	D-Asn - D-아스파라긴
Asp - 아스파라긴산	D-Asp - D-아스파라긴산
Cys - 시스테인	D-Cys - D-시스테인
Gly - 글리신	

Glu - 글루타민산	D-Glu - D-글루타민산
Val - 발린	D-Val - D-발린
Gln - 글루타민	D-Gln - D-글루타민
His - 히스티딘	D-His - D-히스틴
Ile - 이소로이신	D-Ile - D-이소로이신
Leu - 로이신	D-Leu - D-로이신
Lys - 리신	D-Lys - D-리신
Phe - 페닐알라닌	D-Phe - D-페닐알라닌
Met - 메티오닌	D-Met - D-메티오닌
Pro - 프롤린	D-Pro - D-프롤린
Ser - 세린	D-Ser - D-세린
Thr - 트레오닌	D-Thr - D-트레오닌
Trp - 트립토판	D-Trp - D-트립토판
Tyr - 티로신	D-Tyr - D-티로신

(2) : 변형된 비정상 아미노산

Aba-α-아미노-n-부티르산

pClPhe-파라-클로로-페닐알라닌

Cha - 시클로헥실알라닌

Chg - 시클로헥실글리신

Hyp - 히드록시프롤린

I-Tyr - 3-요오도티로신 (3-I-Tyr), 5-요오도티로신(5-I-Tyr), 3,5-디요오도티로신 (3,5-diI-Tyr),

[^{3}H]-Tyr-[3-^{3}H]-티로신 ([3-^{3}H]-Tyr), [5-^{3}H]-티로신 ([5-^{3}H]-Tyr), [3,5-di^{3}H]-티로신 ([3,5-di^{3}H]-Tyr),

[^{125}I]-Tyr - [5-^{125}I]-요오도티로신 ([5-^{125}I]-Tyr), [3-^{125}I]-요오도티로신 ([3-^{125}I]-Tyr), [3,5-di^{125}I]-디요오도티로신 ([3,5-di^{125}I]-Tyr),

[^{131}I]-Tyr - [3-^{131}I]-티로신 ([3-^{131}I]-Tyr), [5-^{131}I]-티로신 ([5-^{131}I]-Tyr), [3,5-di^{131}I]-티로신 ([3,5-di^{131}I]-Tyr)

3,5-diI-Tyr - 3,5-디요오도티로신

ɣMeGlu - D-글루타민산 감마 메틸 에스테르

NMePhe - N-메틸 페닐알라닌

NMePgl - N-메틸 페닐글리신

Npa - β-(나프틸)알라닌

DhPro - 3,4-디히드로프롤린

pNO_2Phe - 파라-니트로-페닐알라닌

pCPhe - 파라-클로로-페닐알라닌

Nle - 노르로이신

Orn - 오르니틴

Pip - 피페콜레이트

Pba - p-아미노페닐 부티르산

DhCin - 3,4-디히드로신나모일

Glt - 글루타릴

Mal - 말레일

Oac - 8-아미노옥탄산

Oct - n-옥틸

Suc - 숙시닐

Glt - 글루타릴

Tfa - 트리플루오로아세틸

- C-말단 아미드

pSubPhe - 파라 치환된 페닐알라닌

Pgl - 페닐글리신

Sar - 사르코신 (N-메틸글리신)

SubPhe - 오르토, 메타, 또는 파라, 모노- 또는 디- 치환된 페닐알라닌

Tha - β-(2-티에닐)-알라닌

Tiq - 테트라히드로이소퀴놀린 3-카르복실레이트

(3) 아미노 및 카르복시 말단 산 치환체

Ac - 아세틸

Azt - 아제티딘-2-카르복실레이트

Cin - 신나모일

다음은 히루딘의 공지된 천연 발생 아미노산 서열 변이체의 서열 목록을 나타낸 것이다.

서열 목록

(히루딘의 아미노산 서열 변이체)

1 5 10 15
Val Val Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys Leu
Ile Thr

20 25 30
Cys Glu Gly Ser Asn Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys Ile Leu
Lys

35 40 45
Gly Ser Asp Gly Glu Lys Asn Gln Cys Val Thr Gly Glu Gly Thr
Asn Lys Gly
Gln Asp

50 55 60
Pro Lys Pro Gln Ser His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro
Asn Glu Asn
Gln

65
Glu Glu Tyr Leu Gln
Asp Asp Glu

(Ala^{63} Tyr^{64} Leu/Asp^{65} Glu^{66})

글리신을 제외한 천연 발생 아미노산은 키랄 탄소 원자를 함유한다. 특별한 언급이 없는 한, 본 명세서에 사용된 광학 활성 아미노산은 L-배열을 가진다. 예를 들면, A_1 또는 A_{10}기의 임의 아미노산은 D- 또는 L-배열을 가질 수 있다. 통상적인 방법에서와 같이, 본 명세서에 기재된 펩티드의 구조는 아미노 말단이 사슬의 왼쪽에 존재하고, 카르복시 말단이 사슬의 오른쪽에 존재하는 구조이다.

알킬기 및 알콕시기의 알킬 부분은 직쇄, 분지쇄 또는 시클릭 알킬기, 예를 들면 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, tert-부틸, 펜틸, 이소펜틸, Sec-펜틸, 시클로펜틸, 헥실, 이소헥실, 시클로헥실 및 시클로펜틸메틸, 헵틸, 옥틸(Oct), 8-아미노옥탄산(Oac)를 포함한다. 탄소수 2 내지 10의 아실기는 1개의 기에 1 또는 2개의 카르보닐 부분을 갖는 직쇄, 분지쇄, 시클릭, 포화 및 불포화 아실기, 예를 들면, 아세틸(Ac), 아제티딘-2-카르복실레이트(Azt), 벤조일 숙시닐, 신나모일(Cin), DhCin, 말레일(Mal) 및 글루타릴(Glt)을 포함한다. 알킬 및 아실 치환체는 할로겐 치환체를 가지는 기들을 포함하며, 할로겐기는 플루오로, 클로로, 브로모, 또는 요오도이며, 예를 들면 트리플루오로아세틸(Tfa)이 있다.

본 명세서에서 사용된 임의의 아미노산은 아미노 치환체를 가지는 임의의 카르복실산을 포함하는 것이 아니라, 폴리펩티드 유도체 업계의 숙련된 사람들이 통상적으로 사용하는 바와 같은 것으로서, 천연적으로 발생하는 아미노산 뿐만 아니라 천연적으로 발생하는 펩티드의 합성 유사체를 제조할 때 펩티드 화학 업계의 숙련된 사람이 통상적으로 사용하는 다른 비 단백질 α-아미노산을 포함한다. 천연적으로 발생하는 아미노산, 즉 L-아미노산은 글리신, 알라닌, 발린, 로이신, 이소로이신, 세린, 메티오닌, 트레오닌, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 시스테인, 프롤린, 히스티딘, 아스파라긴산, 아스파라긴, 글루타민산, 글루타민, 아르기닌, 오르니틴 및 리신이다. 또한 임의의 아미노산은 천연적으로 발생하는 아미노산의 D-아미노산(D-이성질체), 즉 D-알라닌, D-발린, D-로이신, D-이소로이신, D-세린, D-메티오닌, D-트레오닌, D-페닐알라닌, D-티로신, D-트립토판, D-시스테인, D-프롤린, D-히스티딘, 아스파라긴산, D-아스파라긴, D-글루타민산, D-글루타민, D-아르기닌이 있다.

또한 비 단백질 α-아미노산은 예를 들면 노르로이신, 노르발린, 알로이소로이신, 호모아르기닌, 티아프롤린, 디히드로프롤린, 히드록시프롤린(Hyp), 호모세린, 시클로헥실글리신(Chg), α-아미노-n-부티르산(Aba), 시클로헥실 알라닌(Cha), 아미노페닐 부티르산(Pba), 오르토, 메타 또는 파라 위치에 일치환 또는 이치환된 페닐알라닌 [예, 파라 치환된 페닐알라닌(pSubPhe) 및 파라-클로로-페닐 알라닌 및 파라-니트로페닐알라닌(pNPhe)] 또는 다음, 즉 (C_1-C_4)알킬, (C_1-C_4)알콕시, 할로겐 또는 니트로기의 1 또는 2개를 가지는 페닐 부분의 위치에 일 또는 이치환된 페닐알라닌, 또는 메틸렌디옥시기, β-2- 및 β-3-티에닐-알라닌, β-2- 및 β-푸라닐알라닌, β-2-, β-3- 및 β-4-피리딜알라닌, β-(벤조티에닐-2- 및 3-일)알라닌, β-(1- 및 2-나프틸) 알라닌(Npa), 세린, 트레오닌 또는 티로신의 O-알킬화된 유도체, 글루타민 산 및 아스파라긴산의 메틸 에스테르, S-알킬화된 시스테인, 티로신의 O-설페이트 에스테르, 할로겐화된 티로신(예, 3-요오도티로신, 5-요오도티로신, 3,5-디요오도티로신)으로 치환된 페닐알라닌이 있다.

방사성 동위 원소로 표지된 아미노산은 3-[H^3]-티로신, 5-[H^3]-티로신, 3-[I^{125}]-요오도티로신, 5-[I^{125}]-요오도티로신, 3,5-[I^{125}]-디요오도티로신, 3-[I^{131}]-요오도티로신, 5-[I^{131}]-요오도티로신, 및 3,5-[I^{131}]-디요오도티로신을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 히루딘 또는 그의 천연 변이체의 서열은 히루딘에 대해 발견된 아미노산 서열이 사용되는 것을 의미한다.

히루딘 및 그의 변이체에 대해 사용된 그의 부분은 히루딘 또는 그의 변이체로부터 유도된 적어도 4개의 아미노산의 연속 영역을 포함하는 것을 의미한다.

친지성 아미노산은 Tyr, Phe, Leu, Met, Nle, Ile, Val, 및 Pro를 포함한다. L-방향족 아미노산은 티로신 및 페닐알라닌을 포함하는 것을 의미하며, 이러한 아미노산은 방향족 고리를 함유하고 있다.

1 내지 11개의 임의의 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드는 코어 아미노산(A_2-A_9)의 아미노 또는 카르복시 말단으로의 아미노산 첨가가 고유 활성을 가지는 코어 구조를 둘러싼다는 것을 의미한다.

I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, [^{125}I]-Tyr의 0 내지 5개의 잔기는 I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr 또는 [^{131}I]-Tyr을 1개, 여러개, 또는 임의 다른 아미노산과 함께 함유하는 임의 아미노산 1 내지 5개의 잔기를 함유하는 서열을 포함함을 의미한다.

또한, 1-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr 또는 [^{131}I]-Tyr의 정의에 있어서, 대응하는 위치의 유사체, 예를 들면 3-요오도티로신, 5-요오도티로신, 3,5-디요오도티로신, [3-^{3}H]-티로신, [5-^{3}H]-티로신, [3-^{125}I]-요오도티로신, [5-^{125}I]-요오도티로신, [3,5-디^{125}I]-디요오도티로신, [3-^{131}I]-요오도티로신, [5-^{131}I]-요오도티로신, 및 [3,5-디^{131}I]-디요오도티로신을 포함한다. I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr 또는 [^{131}I]-Tyr을 1개, 여러개 또는 임의 다른 아미노산과 함께 함유하는 임의의 아미노산 1 내지 5개의 잔기를 함유하는 서열의 예로서는 Suc I-Tyr I-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha vMeGlu(실시예 3), 또는 I-Tyr I-Tyr 디펩티드 서열의 앞에, 사이에 또는 뒤에 아미노산이 삽입된 것 또는 이들의 조합으로 되는 서열이 있다.

본 발명에 따라서 히루딘에 부착될 수 있는 방사성 동위 원소로 표지된 분자의 다른 예로서는 방사성 할로겐 동위 원소로 표지된 분자가 있다. 진단용 촬영에 유용한 방사성 할로겐 동위 원소의 예로서는, 감마 카메라를 환자에게 주사시킴으로써 촬영하기 위한 ^{125}I 및 ^{123}I, 및 포지트론 단층 X선 촬영을 위한 ^{18}F, ^{75}Br 또는 ^{76}Br이 있으며, 이것에만 제한되는 것은 아니다.

일반식 (I)의 폴리펩티드는 비독성, 유기 또는 무기산과 함께 제약상 허용되는 염을 형성할 수 있다. 적합한 염을 형성하는 무기산의 예로서는 염산, 브롬화수소산, 황산 및 인산, 및 산 금속염, 예를 들면 오르토 인산일수소나트륨 및 황산수소칼륨이 있다. 적합한 염을 형성하는 유기산의 예로서는 모노-, 디- 및 트리카르복실산이 있다. 이와 같은 산의 예로서는, 아세트산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 말론산, 숙신산, 글루타르산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 말레산, 히드록시말레산, 벤조산, 히드록시벤조산, 페닐아세트산, 신남산, 살리실산, 2-페녹시벤조산 및 술폰산(예, 메탄 술폰산 및 2-히드록시에탄 술폰산)이 있다. 카르복시 말단 아미노산 부분의 염의 예로서는 임의의 적합한 무기 또는 유기 염기와 함께 형성된 비독성 카르복실산이 있다. 이러한 염의 예로서는 알칼리 금속, 예를 들면, 나트륨 및 칼륨; 알칼리 토금속, 예를 들면 칼슘 및 마그네슘; 알루미늄을 포함한 IIIA족의 경금속; 및 1급, 2급 및 3급 유기 아민, 예를 들면, 트리알킬아민(예, 트리에틸아민), 프로카인, 디벤질아민, 1-에텐아민, N,N'-디벤질에틸렌디아민, 디히드로아비에틸아민, N-(저급)알킬피페리딘 및 임의 다른 적합한 아민이 있다.

화합물의 일반기에서와 같이 특정기가 바람직하다. 바람직한 일반식 (I)의 펩티드 유도체는, X는 수소, 아세틸 또는 숙시닐이며, A_1은 히루딘 또는 그의 아미노산 1 내지 54를 포함하는 천연 변이체 또는 그의 일부의 서열, 또는 하나의 결합이며, A_2는 I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-Tyr, 또는 Trp, Glu, His, Leu, Phe, D-Phe, SubPhe, NMePhe, Tha, 3,4-DhCin, Cin, Nap, β-(2- 및 3-티에틸)알라닌, β-(2- 및 3-푸라닐)알라닌, β-(2-, 3- 및 4-피리딜)알라닌, β-(벤조티에닐-2- 및 3-일)알라닌, 또는 β-(1- 및 2-나프틸)알리닌의 1 내지 5개의 잔기이며, A_3은 Glu, Ala이며, A_4는 Glu, Asp, Pro 또는 Ala, Azt 또는 Pip이며, A_5는 I1e, Leu이며, A_6는 Pro, Sar, D-Ala, Hyp 또는 NMePgl이며, A_7은 Glu, Gln, Asp 또는 Ala이며, A_8은 Glu, Asp 또는 Ala이며, A_9는 I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr, [^{131}I]-Tyr 또는 Tyr, Ala, Pro, Cha, 또는 디펩티드 Ala-Tyr, Tyr-Leu, Ala-Phe, Tyr-Tyr, Ala-Leu, Tyr-Ala, Glu-Leu, D-Tyr-Leu, Leu-Phe, Sar-Cha, Pro-Cha, Cha-Leu, Ala-Cha, Tyr-Cha이며, A_{10}은 단일 결합, 또는 vMeGlu, Glu, D-Glu, Asn, D-Asn, Pro, Gln, Ala, Lys, D-Lys, Asp, Orn, D-Asp 또는 D-Ala이며, Y는 OH, (C_1-C_8)알콕시, 아미노, 모노 또는 디(C_1-C_4)알킬 치환 아미노산으로 구성되는 군으로부터 선택되는 카르복시 말단 잔기인 것이다.

특히 바람직한 일반식 (I)의 펩티드 유도체는, X는 숙시닐이며, A_1은 하나의 결합이며, A_2는 I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{125}I]-Tyr 또는 [^{131}I]-Tyr이며, A_3은 Glu이며, A_4는 Glu 또는 Pro이며, A_5는 Ile이며, A_6은 Pro이며, A_7은 Glu이며, A_8은 Glu 또는 Asp이며, A_9는 Ala-Cha이며, A_{10}은 vMeGlu이며, Y는 OH인 것이다.

본 발명의 단백질은 당 업계의 숙련된 사람들에게 공지된 여러 방법으로 쉽게 제조할 수 있다. 이와 같은 방법으로서는 용액상 펩티드 합성법, 고상 연속 및 블록 합성법 및 유전자 클로닝법 및 이들 기술의 조합 등이 있다. 고상 연속 방법은 자동화된 펩티드 합성기를 사용하는 바와 같은 정립된 자동화 방법을 사용하여 행할 수 있다. 이 방법에 있어서, 펩티드는 보호된 아미노산 C-말단으로 시작하여 수지 상에서

합성된다. 사용된 수지 지지체는 폴리펩티드의 고상 제조를 위해 당업계에 사용되었던 종래의 적합한 모든 수지, 바람직하기로는 약 0.5 내지 약 3 %의 디비닐 벤젠과 가교된 폴리스티렌일 수 있으며, 이것은 클로로메틸화 또는 히드로시메틸화되어, 초기에 도입된 α-아미노 보호된 아미노산과 함께 에스테르 형성을 위한 부위를 제공한다. C-말단 아미드를 위해 프리메틸벤질히드록시아민 수지를 사용할 수 있다. 서열의 커플링을 종결한 후, Boc 보호기는 제자리에 남겨두거나 또는 제거하고, N-말단 아미노기는 아실화시킨다. 수지로부터 보호된 단편을 적절한 아미노 알콜을 사용하여 제거시켰다.

히드록시메틸 수지의 예는 보단스즈끼(Bodanszky) 등의 Chem. Ind, (London) 제38호, 제1597-1598페이지(1966년)에 기재되어 있다. 클로로메틸화된 수지는(캘리포니아주 리치몬드 소재의 Bio Rad Laboratories 사로부터 구입할 수 있거나, 이와 같은 수지의 제조 방법은 스트워트(Stewart, et al) 등의 Solid Phase Peptide Synthesis(샌프란시스코 소재 Freeman Co.사, 1969년), 제1장, 제1-6페이지에 기재되어 있다. 보호된 아미노산은 기신(Gisin)의 Helv. Chem. Acta, 제56호, 제1476페이지(1973년)에 기재된 방법으로 수지에 결합시킬 수 있다. 수지에 결합된, 보호된 많은 아미노산은 구입할 수 있다. 한 예로서, 카르복시 말단이 νMeGlu 잔기인 본 발명의 폴리펩티드를 제조하기 위해서는, 벤질화되고 히드록시메틸화된 페닐아세트아미도메틸(PAM)에 결합되고 tert-부틸옥시카르보닐(Boc)로 보호된 νMeGlu를 사용할 수 있다.

수지 지지체에 α-아미노 보호된 아미노산을 커플링시킨 다음에 보호기를 임의 적합한 방법, 예를 들면 염화메틸렌 중의 트리플루오로아세트산, 트리플루오로아세트산 단독, 또는 디옥산 중의 HCl을 사용하여 제거한다. 탈보호는 0 ℃ 내지 실온에서 행한다. 특정 α-아미노 보호기의 제거를 위한 조건 및 다른 표준 절단 시약을 사용할 수 있다. α-아미노 보호기를 제거한 후에, 다른 아미노 보호 아미노산을 목적하는 순서대로 단계적으로 커플링시킨다. 다른 방법으로서는, 수지로 지지된 아미노산 서열과 커플링시키기 전에 용액법으로 여러개의 아미노산기를 커플링시킬 수 있다.

폴리펩티드 서열 중에 도입되는 각각의 아미노산과 함께 사용되는 α-아미노 보호기는 당 업계에 공지된 임의 보호기일 수 있다. α-아미노 보호기의 군 중에서 (1) 아실계 보호기, 예를 들면 포르밀, 트리플루오로아세틸, 프탈릴, 톨루엔술포닐(토실), 벤젠술포닐, 니트로페닐술페닐, 트리틸술페닐, O-니트로페녹시아세틸 및 α-클로로부티릴; (2) 방향족 우레탄계 보호기, 예를 들면 벤질옥시카르보닐 및 치환된 벤질옥시카르보닐, 예를 들면 p-클로로벤질옥시카르보닐, p-니트로벤질카르보닐, p-브로모벤질옥시 카르보닐, p-메톡시벤질옥시카르보닐, 1-(p-비페닐일)-1-메틸에톡시카르보닐, α,α-디메틸-3,5-디메톡시벤질옥시카르보닐 및 벤즈히드릴옥시카르보닐; (3) 지방족 우레탄계 보호기, 예를 들면 tert-부틸옥시카르보닐(Boc), 디이소프로필메톡시카르보닐, 이소프로필옥시카르보닐, 에톡시카르보닐 및 알릴옥시카르보닐; (4) 시클로알킬 우레탄계 보호기, 예를 들면 시클로펜틸옥시카르보닐, 아다만틸옥시카르보닐 및 시클로헥실옥시카르보닐, (5) 티오우레탄계 보호기, 예를 들면 페닐티오카르보닐; (6) 알킬계 보호기, 예를 들면 트리페닐메틸(트리틸) 및 벤질 등이 있다. 바람직한 α-아미노 보호기는 tert-부틸옥시카르보닐이다.

고상 펩티드 합성 업계에 공지된 바와 같이, 많은 아미노산은 사슬을 형성하는 동안에 보호를 필요로 하는 관능기를 함유한다. 적절한 보호기의 사용 및 선택은 당 업계의 숙련된 사람의 능력에 속하는 일이며, 보호하고자 하는 아미노산에 의존하며, 펩티드 상에 다른 보호된 아미노산 잔기의 존재에 의존하게 된다. 이와 같은 측쇄형 보호기의 선택은 α-아미노 부분 보호기를 절단하는 동안에 절단에 의해 제거되지 않는 것이어야 한다는 점에서 중요하다. 예를 들면, 리신을 위한 적합한 측쇄형 보호기는 벤질옥시카르보닐 및 치환된 벤질옥시카르보닐이며, 상기 치환체는 할로(예, 클로로, 브로모, 플루오로) 및 니트로(예, 2-클로로벤질옥시 카르보닐, p-니트로 벤질옥시카르보닐, 3,4-디클로로벤질옥시카르보닐), 토실, t-아밀옥시 카르보닐, t-부틸옥시카르보닐 및 디이소프로필 메톡시카르보닐로부터 선택된다. 트레오닌 및 세린의 알콜성 히드록실기는 아세틸, 벤조일, tert-부릴, 트리틸, 벤질, 2,6-디클로로벤질 또는 벤질옥시카르보닐기로 보호시킬 수 있다. 바람직한 보호기는 벤질이다.

적절한 커플링제의 선택은 당 업계의 기술에 속한다. 첨가되는 아미노산이 Gln, Asn 또는 Arg인 경우, 특히 적합한 커플링제는 N,N'-디이소프로필카르보디이미드 및 1-히드록시벤조트리아졸이다. 이러한 시약을 사용하면, 니트릴 및 락탐 형성이 방지된다. 다른 커플링제로서는 (1) 카르보디이미드(예, N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 및 N-에틸-N'-(ν-디메틸아미노프로필카르보디이미드); (2) 시아나미드(예, N,N-디벤질시아나미드); (3) 케텐이민; (4) 이소옥사졸륨염(예, N-에틸-5-페닐-이소옥사졸륨-3'-술포네이트); (5) 고리에 1 내지 4개의 질소를 함유하는 방향족 특성의 모노시클릭 질소 함유 헤테로시클릭 아미드, 예를 들면 이미다졸리드, 피라졸리드, 및 1,2,4-트리아졸리드(유용한 특정 헤테로시클릭아미드는 N,N'-카르보닐디이미다졸 및 N,N-카르보닐-디-1,2,4-트리아졸임); (6) 알콕시화된 아세틸렌(예, 에톡시아세틸렌); (7) 아미노산의 카르복실 부분과 혼합 무수물을 형성하는 시약(예, 에틸클로로포르메이트 및 이소부틸클로로포르메이트), 또는 커플링되는 아미노산의 대칭성 무수물(예, Boc-Ala-O-Ala-Boc); (8) 하나의 고리 질소 상에 하나의 히드록시기를 가지는 질소 함유 헤테로시클릭 화합물(예, N-히드록시 프탈이미드, N-히드록시숙신이미드 및 1-히드록시벤조트리아졸); 및 (9) 카스트로스 시약 (BOP)(Castro's reagent)이 있다. 다른 활성화제 및 이들의 펩티드 커플링에서의 용도는 카푸어(Kapoor)의 J. Pharm. Sci., 제59호, 제1-27페이지(1970)에 기재되어 있다. Arg, Asn 및 Gln을 제외한 모든 아미노산을 위한 커플링제로서 대칭성 무수물을 사용하는 것이 바람직하다.

각각의 보호된 아미노산 또는 아미노산 서열은 고상 반응기 중에 약 4배의 과량으로 도입시키며, 커플링은 디메틸포름아미드: 염화메틸렌 (1:1)의 매질 또는 디메틸포름아미드 단독 또는 바람직하게는 염화메틸렌 단독 매질에서 수행한다. 불완전 커플링이 일어나는 경우에 있어서, 고상 반응기 중에서 다음 아미노산을 커플링하기 전인 α-아미노 보호기를 제거시키기 전에 커플링 과정을 반복한다. 합성의 각 단계에서 커플링 반응의 성공은 이 카이저(E. Kaiser, et al) 등의 Analyt. Biochem. 제34호, 제595페이지(1970)년에 기재된 바와 같이 닌히드린 반응에 의해 검사한다.

α-아미노 보호된 아미노산을 수지 지지체에 커플링시킨 다음, 보호기는 임의 적합한 방법, 예를 들면 염화메틸렌 중의 트리플루오로아세트산, 트리플루오로아세트산 단독 또는 디옥산 중의 HCl을 사용하여 제거한다. 탈보호는 0℃ 내지 실온에서 행한다. 특정 α-아미노 보호기 제거를 위한 조건 및 다른 표준 절단 시약을 사용할 수 있다. α-아미노 보호기를 제거한 후, 다른 아미노 보호된 아미노산을 목적하는

순서대로 단계적으로 커플링시킨다. 다른 방법으로서는, 수지로 지지된 아미노산 서열과 커플링시키기 전에 용액법으로 여러개의 아미노산기를 커플링시킬 수 있다.

목적하는 아미노산 서열을 얻은 후에, 이 펩티드를 수지로부터 제거시키며, 탈보호시킨다. 이것은 스케빈저(예, 아니솔)의 존재 중에서 무수 HF 용액으로 수지에 결합된 폴리펩티드를 처리하는 바와 같은 가수분해에 의해 행할 수 있다. 전형적으로는 펩티드 사슬 합성이 종결된 후에 보호기를 제거하지만, 적절한 시간에 언제라도 보호기를 제거시킬 수 있다.

탈보호된 펩티드의 정제 및 분석은 다수의 표준 방법으로서 성취된다. 적절한 정제 및 분석 방법의 선택은 당 업계의 기술에 속한다. 적합한 정제 방법은 예비 HPLC이다. 정제된 펩티드의 분석은 분석 HPLC, 아미노산 분석, 고속 원자 폭격 질량 분광분석 및 다른 임의 적합한 분석 수단으로 행할 수 있다.

[방사성 동위 원소로 표지된 펩티드]

본 발명의 방사성 동위 원소로 표지된 펩티드는 연구 및 치료에 있어서 트롬빈 및 트롬빈 복합체의 시험관내 및 생체내 연구에 유용하거나, 또는 그의 분석 또는 진단 키트에 유용하고, 방사성 동위 원소로 표지된 트롬빈 결합제의 제조를 위해 유용하다. 본 발명의 하나의 실시 태양은 상기와 같은 복합체를 안정화시킬 수 있는 트롬빈의 혈전 용해 활성을 감소시키거나 제거하는 트롬빈 결합 펩티드를 방사성 동위 원소로 표지시키는 방법이다. 이러한 하나의 예로서, 혈병 중에 혼입시킨 트롬빈의 방사선 촬영 기술에 의해 트롬빈의 위치 및 분포를 결정할 수 있게 되었다.

펩티드의 방사성 요오드에 의한 표지화는 일반적으로 클로라민 T 방법 (Chloramine T method)를 사용하여 행한다. 펩티드를 표지시키는 클로라민 T 이외의 다른 방법으로서는 (1) 일염화요오드 방법, (2) 다른 화학적 산화 방법, (3) 전기분해성 요오드화 방법, (4) 효소적 요오드화 방법이 있으며, 다른 방법으로서, (5) 단백질 및 폴리펩티드의 요오드화를 위한 공액 표지화 방법은 N-숙신이미딜 3-(4-히드록시 5-[^{125}I] 요오드페닐)프로피오네이트(Bolton-Hunter 시약)를 사용하는 당 업계에 숙련된 사람에게 공지된 방법이다. 다른 적합한 표지화 방법으로서, 예를 들면, 메틸 p-히드록시 벤즈이미데이트 염산염은 방사성 요오드로 표지된 디아조화된 아닐린과 마찬가지로 요오드화제로서 사용된다. 요오드화된 펩티드를 삼중수소를 함유하는 펩티드로 전환시키는 방법은 산화팔라듐 및 삼중수소 가스와 함께 접촉 환원법을 사용하여 성취시킬 수 있다.

[치료적 용도]

본 발명의 펩티드 유도체의 항응고 투여량은 환자, 치료할 혈전증의 심도 및 선택된 펩티드 유도체에 의존하여 하루에 0.2㎎/㎏(체중) 내지 250㎎/㎏(체중)이다. 구체적인 환자에 대한 적합한 투여량은 쉽게 결정할 수 있다. 바람직하기로는, 1회 투여 당 유효 성분 5㎎ 내지 100㎎으로 하루에 1 내지 4회 분할 투여할 수 있다. 보관된 전혈과 같은 체외 매질에서의 혈액 응고를 억제하거나 방지하는데 필요한 본 발명의 펩티드의 양은 당 업계의 숙련된 사람에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

항응고성 치료는 다양한 혈전성 질병, 특히 관동맥 및 뇌혈관 질환의 치료 및 방지를 의미한다. 이 분야에 경험이 많은 사람은 항응고성 치료를 필요로 하는 상황을 쉽게 알 수 있다. 본 명세서에 사용된 환자는 사람, 양, 말, 소, 돼지, 개, 고양이, 쥐 및 생쥐를 포함하여 영장류와 같은 포유류를 의미한다. 혈액 응고의 억제는 혈전성 질병을 가지는 개개인의 항응고성 치료뿐만 아니라, 혈액 응고의 억제가 요구되는 경우 예를 들면 저장된 전혈에서의 응고를 방지하고, 시험 또는 저장용 다른 생물학적 시료에서의 응고를 방지하는데 유용하다.

펩티드 유도체 중 일부는 경구 투여 후에 소화관을 통해 소화되지 않고 통과할 수 있지만, 비경구 투여, 예를 들면, 피하, 정맥내, 근육내 또는 복강내 투여가 바람직하며; 촉적질 주사에 의한 투여; 이식 제제에 의한 투여; 또는 스프레이 또는 건조 분말 형태 중의 본 발명의 펩티드 유도체를 함유하는 에어로졸 캔(can)으로 코, 인후, 및 기관지관의 점막에 적용시키는 방법이 바람직하다.

비경구 투여를 위해서, 화합물은 계면 활성제 및 다른 제약상 허용되는 보조제의 첨가 또는 첨가없이 물 및 오일과 같은 멸균액일 수 있는 제약상 허용되는 담체와 함께 생리학상 허용되는 희석제 중에서 화합물을 용해 또는 현탁시킨 용액 또는 현탁액의 주사 투여제로서 투여할 수 있다. 이러한 제제 중에 사용될 수 있는 오일의 예로서는 석유, 동물유, 식물유, 또는 합성원료 예를 들면 땅콩유, 대두유 및 광유가 있다. 일반적으로, 물, 염수, 덱스트로오스 수용액 및 관련 당 용액, 에탄올 및 글리콜, 예를 들면 프로필렌 글리콜, 또는 폴리에틸렌 글리콜이 바람직한 액체 담체, 특히 주사액용 액체 담체이다.

상기 화합물은 유효 성분을 서방형 촉적질 주사제 또는 이식 제제 형태로 투여할 수 있다. 유효 성분은 펠릿 또는 소형 원통형으로 압착시키고, 촉적질 주사제 또는 이식제로서 피하 또는 근육내 이식시킬 수 있다. 이식제는 생분해성 중합체 또는 합성 실리콘과 같은 불활성 물질, 예를 들면 실리콘 고무인Silastic(Dow-Corning Corporation사 제품)을 사용할 수 있다.

[실시예]

본 발명은 다음 실시예로써 예시되지만, 이 실시예가 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

[실시예 1]

Suc 3,5-di I-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu의 합성

Suc 3,5-di I-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu는 ABI 430A 펩티드 합성기를 사용하여 고상 방법으로써 합성하였다. 이어서, Nα-Boc 보호된 아미노산의 대칭성 무수물(미리 제조됨)은 ABI에 의해 공급된 이중 커프링 프로토콜을 사용하여 Boc-glu(Bzl) 메리필드(Merrifield) 수지(0.34 meg/g)에 첨가하였다. 다음과 같은 측쇄 보호가 사용되었다. 즉, 3,5-di I-Tyr(3-Br-Bzl); Glu(Bzl). 수지에 결합된 펩티드의 N-말단을 숙신산 무수물로 숙시닐화시켰다.

아니솔의 존재하에 0℃에서 30분 동안 무수 HF를 사용하여 수지로부터 펩티드를 절단시켰다. 이 펩티드는 5% HoAc, H_2O, 30% CH_3CN으로 추출하고, 동결건조하였다. 동결건조물을 30-40 % CH_3CN/수성 TFA의 구배로 Beckman Ultraprep C-18 컬럼(50.8×150㎜)를 사용하여 80 ㎖/분의 유속으로 역상 HPLC를 행하여 정제하였다.

히루딘 펩티드의 직접 요오드 화는 Na[^{125}I]로 행하였다. 일반적으로, 0.5M 인산나트륨(pH7.5) 중의 히루딘 펩티드(2 ㎎/㎖) 50 ㎍을 클로라민-T(0.5M 인산염 완충액 중의 1.25 ㎎/㎖) 10 ㎕를 첨가함으로써 요오드화시켰다. 이 반응을 24℃에서 30초 동안 행하였다. 이이서, 반응을 메타중아황산나트륨 25 ㎕(0.5M 인산염 완충액 중의 1.25㎎/㎖)를 첨가함으로써 종결시켰다. 요오드화 반응물을 즉시 Bio-Gel P-2 칼럼(2.6×50㎝)에 적용시키고, 0.1M 붕산나트륨 완충액(pH8.5)으로 평형시켰다. [^{125}I]) 분자의 약 85 %를 컬럼 크로마토그래피로써 결정한 단백질에 옮겼다. 이어서, 표지된 히루딘 펩티드를 1 % 소 혈청 알부민, 0.1M 붕산나트륨 완충액(1:1)에 첨가하고, 여러개의 바이알에 나누어 -20℃에서 저장하였다. 표지된 히루딘의 갓 해동시킨 시료를 각각의 실험에 사용하였다. 저장 후에, TKS-3000 HPLC컬럼 상에서 표지된 히루딘 펩티드를 다시 크로마토그래피하여, 표지되지 않은 히루딘 펩티드의 용출 프로필과 일치하는 방사성 활성의 단일 피크를 얻었다.

히루딘 펩티드를 접촉 환원에 의해 적정하였다. 펩티드 15 ㎎을 H_2O 2 ㎖ 및 트리에틸아민 30㎕ 중에 현탁시켰다. 이 용액에 산화알루미늄백금 30 ㎎을 첨가하였다. 환원 분위기를 실온에서 1시간 동안 유지시켰다. 초기에 반응물을 여과기 상에서 H_2O로 세척하여 비흔입된 표지물을 제거하였으며, 생성된 조야한 물질을 재 단리하였다(Dupont-NEN Research Catalog 제22페이지, Cat. #8259, Catalytic Reduction with Platium Oxide 참조).

정제된 표지된 펩티트의 분석 결과는 FAB-MS에 의해 목적하는 분자 이온 피크를 제공하고, 목적하는 펩티드와 일치하는 아미노산 분석 결과를 가졌다. 이 방법에 의해, 다음의 펩티드는 다음에 기술하는 물성을 가진다는 것을 알 수 있었다.

시료를 트롬빈에 의해 유발된 피브린 혈병 억제 분석에 대해 시험하였다. 분석 용액은 0.12M 염화나트륨, 0.01M 인산나트륨, 0.01% 아지드화나트륨 및 0.1% 소혈청 알부민을 함유하는 분석용 완충액(pH7.4)으로 제조하였다. 소의 트롬빈을 적절한 농도로 적정하여, 피브린 혈병 형성을 405㎚에서 60분 이내에 마이크로 적정기 판 기록기(Bio-Tek EL 309)로써 검출할 수 있게 하였다. 이 트롬빈 용액(50 ㎕: 0.2pmol)을 시험할 합성 펩티드의 용액 50㎕를 함유하는 마이크로 적정기 판의 웰에 첨가하였다. 1분간 교반시키고, 24℃에서 10분 동안 추가로 인큐베이션시킨 후, 0.1% EDTA 중의 희석된 혈장(1:10) 100 ㎕를 첨가하고 20초 동안 와동시켰다. 이 용액의 혼탁도는 5분 간격으로 자동 기록기로써 모니터하였다. 이 결과로부터 IC_{50}을 계산하였다. IC_{50}은 억제제를 함유하지 않은 대조용에 대해 관찰된 혼탁도의 50%가 되는 펩티드의 농도를 의미한다. 이것은 피브린 혈병 형성 시간의 2배 증가에 상당한다. 인간 또는 소의 트롬빈을 사용하는 분석의 경우, 트롬빈은, 30분에 걸쳐 동일 속도로 피브린 혈병이 생기는 농도까지 적정하였다. 이 방법에 의해, 다음의 펩티드는 다음의 생물학적 특성을 가진다는 것을 알 수 있으며, +는

25μM 내지 200μM을 나타내며, ++는 IC_{50}25 μM을 나타내며, nt는 결정되지 않음을 나타낸다.

1) Suc 3,5-diI-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu

MW 1582, FAB-MS (MH)+ 1581

아미노산 분석

Z(4)	Pro(2)	Ile(1)	Tyr(1)	Ala(1)
4.09	1.96	0.96	0.98	0.99

시험관내 효능: ++

2) Suc [^{3}H]-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu

MW 1995, FAB-MS (MH)+ 1996.3

표지화 및 NEN까지 수축된 분석

시험관내 효능: nt.

3) Suc 3,5-diI-Tyr 3,5-diI-Tyr Glu Pro Ile Pro Glu Glu Ala Cha D-Glu

MW 1995, FAB-MS (MH)+ 1996.3

아미노산 분석:

Z(4)	Pro(2)	Ile(1)	Tyr(2)	Ala(1)
4.09	1.96	0.96	1.95	0.99

시험관내 효능: ++

(57) 청구의 범위

청구항 1

방사성 동위 원소로 표지된 다음 일반식의 펩티드 유도체. X-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-A_{10}-Y 식 중, X는 수소 또는 숙시닐이고, A_1은 하나의 결합이며, A_2는 I-Tyr, [^{3}H]-Tyr, [^{131}I]Tyr, 3,5-diI-Tyr 또는 3,5-diI-Tyr-3,5-diI-Tyr이고, A_3은 Glu이며, A_4는 Pro이고, A_5는 Ile이고, A_6은 Pro이며, A_7은 Glu이고, A_8은 Glu이고, A_9는 Ala, Cha, Cha-Cln, Cha-Asn 또는 Ala-Cha이고, A_{10}은 D-Glu이고, Y는 카르복시 말단이다.

청구항 2

제1항에 있어서, A_9가 Ala-Cha인 펩티드 유도체.

청구항 3

제1항에 있어서, X가 H인 펩티드 유도체.

청구항 4

제1항에 있어서, A_9가 I-Tyr, [^{3}H]-Tyr 또는 [^{131}I]Tyr인 펩티드 유도체.

청구항 5

제1, 2, 3 및 4항 중 어느 하나의 항의 펩티드 유도체의 혈액 항응고 유효량을 시험관내 매질과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관내 매질 중의 혈액 응고를 감소시키는 방법.

청구항 6

제1, 2, 3 및 4항 중 어느 하나의 항의 표지된 히루딘 펩티드를 사용하여 혈액, 조직 또는 스페슘(specium) 시료 중의 트롬빈의 농도를 측정하기 위한 시험관내 트롬빈을 검출하기 위한 분석 또는 진단용 키트.

청구항 7

(a) A_{10}기로부터 C-말단이 보호된 아미노산이 적당하게 결합된 수지를 사용하는 단계. (b) 다른 α 아미

노 보호된 아미노산 A_9 내지 A_1을 순차적으로 커플링시켜 제1, 2, 3 및 4항 중 어느 한 항에 따른 보호된 아미노산 서열을 얻는 단계, (c) 상기 보호기를 제거하고, 목적하는 펩티드를 정제하는 단계, (d) 이 펩티드를 방사성 할로겐으로 표지시키고, 표지된 펩티드를 정제하는 단계를 포함하는, 제1, 2, 3 및 4항 중 어느 하나의 항에 기재된 펩티드 유도체 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제조하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, X가 숙시닐인 펩티드 유도체.