



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **309040**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 K 7/02, A 61 K 38/55

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19924834	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1991.06.14, PCT/CA91/00213
(22) Inng. dag	1992.12.14	(85) Videreføringsdag	1992.12.14
(24) Løpedag	1991.06.14	(30) Prioritet	1990.06.15, US, 538322
(41) Alm. tilgj.	1992.12.15		
(45) Meddelt dato	2000.12.04		

(71) Patenthaver	National Research Council of Canada, Montreal Road, Ottawa, ON K1A 0R6, CA
(72) Oppfinner	John Dimaio, Montréal, QC, CA Feng Ni, Pierrefonds, QC, CA Yasuo Konishi, St.Laurent, QC, CA
(74) Fullmektig	Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) Benevnelse **Analogifremgangsmåte for fremstilling av terapeutisk aktive peptid-derivater**

(56) Anførte publikasjoner WO 91/02750
Dimaio, J. et al, Bifunctional thrombin inhibitors..., Journal of biological chemistry, ISSN 0021-9258, 15. des. 1990, vol. 265, nr. 35, s. 21698-21703

(57) Sammendrag

En trombin-inhibitor som omfatter en første større hydrofob del som virker på det katalytiske sete av trombin som er ansvarlig for proteolyse og en andre del som i det minste opprettholder den hydrofobe og sure karakter til aminosyrene 55 til 60 i nativt hirudin ved den C-terminale ikke-katalytiske region av N-acetyl-hirudin₄₅₋₆₅. Mellom den første og andre del er en toverdig linker-gruppe med en kjedelengde på minst 10 karbonatomer. Fortrinnsvis omfatter den større hydrofobe del minst én aminosyre i D-konfigurasjon. Forbindelsene er nyttige for behandling av trombotiske sykdommer.

Område for oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av peptid-derivater som er nyttige som trombin-inhibitorer. Disse peptider er basert på sekvensen til det segmentet av hirudin som inneholder aminosyrene 45 til 65 med passende modifikasjoner som gir forsterket binding opp til tre størrelsesordener større enn det tilsvarende native peptid-fragment. Peptidene ifølge foreliggende oppfinnelse betegnes "bifunksjonelle" trombin-inhibitorer eftersom de bindes til to forskjellige bindings-seter på trombin-molekylet.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Trombin er en viktig serin-proteinase-komponent ved blod-koagulerings-kaskaden. Ved siden av å starte blod-levring ved spaltning av fibrinogen, aktiverer trombin andre blod-koagulerende faktorer innbefattet faktor V, VIII og XIII, og anti-koagulerings-enzymet protein C. Trombin er også en kraftig blodplate-aktivator som svekker trombolyse mediert ved vev-plasminogen-aktivator in vivo. Trombins positive feedback regulering tjener således til å forsterke hemostase, men forårsaker livstruende tromber som reaksjon på aberrasjoner ved vaskulære og cerebrovaskulære arterier.

Gitt de forskjellige funksjoner til dette enzym, kan hemning av dette med kraftige og spesifikke forbindelser være et verdifullt tillegg til behandling av sykdommer beslektet med trombose. Disse omfatter koronare arterie-sykdommer, cerebrovaskulære sykdommer, perifere arterielle okklusive sykdommer, dyp vene-trombose og pulmonart emboli.

Den kraftigste kjente inhibitor for trombin er hirudin, en familie av isoproteiner isolert fra kjertel-sekret hos iglen *Hirudo Medicinalis*. Antikoagulerings-egenskapene til hirudin har vært kjent i lang tid. Imidlertid har de hittil vært av liten terapeutisk verdi, eftersom formulering av dette protein til en raskt effektiv og administrerbar form synes å være vanskelig, eftersom både enteral og kutan absorpsjon er

meget liten og det således ikke har vært mulig å frembringe tilstrekkelig nivå av proteinet i blodstrømmen.

Videre er klinisk anvendelse av hirudin isolert fra igle-ekstrakter utenkelig, på grunn av dens begrensede mengde, omkostninger og allergiske reaksjoner som ofte kan finne sted ved administrering av fremmed-proteiner med størrelsen til hirudin.

I sin publikasjon med tittelen "Pharmacology of selective thrombin inhibitors", (1988), Nouv. Rev. Fr. Hematol., 30, side 161-165, ga Markwardt ytterligere klinisk informasjon angående hirudin, basert på resultater av farmakologiske undersøkelser utført både for naturlige og syntetiske trombin-inhibitorer.

Forfatteren gjør generelle observasjoner angående hirudin, idet han nevner at peptidet som inneholder en sterkt sur C-terminal-del, er meget spesifikt for α -trombin. Han konkluderer derefter med at C-terminal-delen av hirudin sannsynligvis bindes til den anioniske bindings-sete-region av enzymet, mens den kompakte N-terminal-delen synes å bindes til den aktive sete-region til enzymet.

Det er funnet at nativt desulfo-hirudin₄₅₋₆₅ hemmer fibrinogen pluggdannelse både ved bovint og humant α -trombin på en doseavhengig måte. IC₅₀-verdien 940 ± 200 nM for bovint α -trombin er i god overensstemmelse med den angitte verdi for plasmafibrin-klumpdannelse for det samme fragment, og tre ganger lavere enn hirudin₅₅₋₆₅, som er angitt som minimum-kjernen som er nødvendig for antikoagulerings-aktivitet. Det er også demonstrert at de samme peptider konsekvent var kraftigere mot humant α -trombin enn bovint α -trombin.

Forskjellig kjent litteratur innen området har også demonstrert at det aktive fragment av aminosyre-sekvensen til hirudin synes å være aminosyresekvensen som omfatter aminosyrene 45 til 65. Det har således vært gjort anstrengelser for å øke den inhiberende aktiviteten til peptidet ved å substituere noen av aminosyrene som er til stede i denne sekvensen.

Krstenansky et al, i "Antithrombin properties of C-termi-

nus of hirudin using synthetic unsulfated N α -acetyl-hirudin" (1987), Febs Letters, Vol. 211, No. 1, side 10-16, beskriver syntesen av det C-terminale fragment ikke-sulfatert N α -acetyl-hirudin₄₅₋₆₅. Forfatterne henviser til tidligere arbeider (Chang, J.-V, FEBS Letters, 164, 307 (1983)) og nevner at dette fragment potensielt kunne inneholde to spesifikke bindings-områder, ett som bindes til det katalytiske sete til trombin og det andre som bindes til et annet gjenkjennelses-sete på trombin. Begge forfatterne konkluderte med at dette ikke var tilfelle.

Forfatterne demonstrerte allikevel at 45-65-sekvensen av hirudin har evnen til å hemme klumpnings-aktivitet så vel som å frigjøre fibrinopeptid A hos trombin. De foreslo også at den samme sekvensen av hirudin₄₅₋₆₅ ikke kunne være direkte innblandet ved binding med det katalytiske sete hos trombin, eftersom de amidolytiske egenskapene til trombin overfor syntetiske substrater ikke blir forstyrret.

I artikkelen av Krstenansky et al. betegnet "Anticoagulant peptides, nature of the interaction of the C-terminal region of hirudin with a noncatalytic site on thrombin", (1987), J. Med. Chem. 30, side 1688-1691, angir forfatterne at minimum aktiv sekvens ved det ikke-katalytiske bindingssete av trombin er hirudin₅₆₋₆₄. Basert på denne antagelse angir forfatterne syntese av flere C-terminal hirudin₅₄₋₆₅-analoger og deres evne til å hemme trombin-fremkalt fibrin-klumpdannelse for å påvise naturen til den gjensidige virkning mellom hirudin₅₆₋₆₄ og et ikke-katalytisk bindingssete til trombin.

I sin konklusjon nevner forfatterne at den C-terminale regionen til hirudin kan bindes til en region med fibrinogen binding på trombin som ikke er den region som hittil er foreslått i litteraturen.

I artiklene av Dodt et al. (Interaction of site specific hirudin variants with α -thrombin (1988), Febs Letters, Vol. 229, No. 1, side 87-90), Degryse et al. (Point mutations modifying the thrombin inhibition kinetics and antithrombotic activity in vivo of recombinant hirudin (1989), Protein

Engineering, Vol. 2, No. 6, sider 459-465) og Braun et al. (Use of site-directed mutagenesis to investigate the basis for the specificity of hirudin (1988), Biochemistry, 27, side 6517-6522), angir forfatterne resultatene av sete-styrt mutagenese utført på hirudin-genet. Inhibering av trombin ved mutant hirudin-peptider er undersøkt.

I disse publikasjonene undersøkte forfatterne mutasjoner utført på hele proteinet, og begrenset seg ikke til 45-65-segmentet av hirudin. Videre ble modifikasjonene utført på 45-65 segmentet begrenset til en enkel modifikasjon, vanligvis i posisjon 47, for å illustrere at denne resten ikke virker med det aktive sete, selv om disse publikasjonene også viser mutasjoner i posisjonene 51, 57, 58, 61 og 62.

På lignende måte beskriver artikkelen av Dodt et al., betegnet "Distinct binding sites of Ala⁴⁸-Hirudin¹⁻⁴⁷ and Ala⁴⁸-Hirudin⁴⁸⁻⁶⁵ on α -thrombin", (1990), The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265, No. 2, s. 713-718, forsøk rettet mot å utføre sete-styrt mutagenese av hirudin i posisjon 48 i sekvensen. Arbeidet utført av Dodt et al. i dette tilfellet synes å være begrenset til å erstatte prolin med alanin i denne stilling for å lette den påkrevde proteolyse som var nødvendig for forsøket deres.

Endelig beskriver Maraganore et al., i "Anticoagulant activity of synthetic hirudin peptides" (1989), The Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, No. 15, side 8692-8698, Dennis et al. i "Use of fragments of hirudin to investigate thrombin-hirudin interaction", (1990), Eur. J. Biochem. 188, side 61-66 og Chang et al. i "The structural elements of hirudin which bind to the fibrinogen recognition site of thrombin are exclusively located within its acidic C-terminal tail" (1990), Febs., Vol. 261, No. 2, side 287-290, syntese og anti-koagulerings-egenskapene til en rekke peptider hvis sekvenser er basert på sekvensen av forskjellige fragmenter av nativt hirudin.

Forbindelser med anti-koagulerings-egenskaper er verdifulle terapeutiske midler som kan anvendes ved behandling av forskjellige patologiske tilstander. Blant de mest betydningsfulle

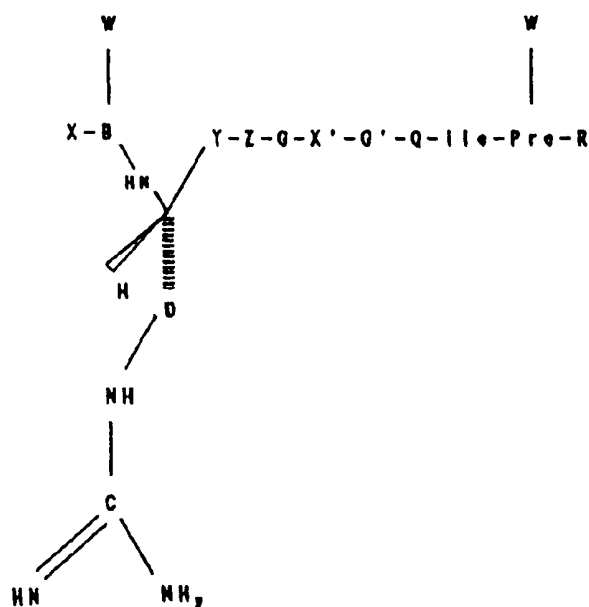
ningsfulle tilstander hvor antikoagulasjons-behandling kan være nyttig, kan nevnes myokardialt infarkt, pulmonar emboli og cerebral-vaskulære sykdommer, dyp vene trombose og andre indikasjoner på trombotiske forstyrrelser.

Antikoagulanter som for tiden er tilgjengelige er i mange henseender utilfredsstillende. F.eks. er heparin anvendt for å hemme aktiviteten til trombin og således ved behandling av tilstander så som vene-trombose og trombe-emboli. Imidlertid oppviser heparin en rekke uønskede bivirkninger som demonstrerer behovet for antikoagulanter som gir mer fordelaktige toksisitetsnivåer.

Konstruksjon av lavmolekylvekt- og spesifikke inhibitorer av trombin som anvender aksessoriske bindings-steder fjernt fra eller i forbindelse med det katalytiske senter, på lignende måte som fibrinogen eller hirudin bindes til trombin, utgjør en utfordring innen protein-kjemi. Muligens integrerer en slik multifunksjonell inhibitor to eller flere rekognitive elementer, adskilt med en hensiktsmessig spacer som favoriserer flere samtidige virkninger og som kan manifestere øket styrke og spesifisitet. Innføring av "fremmede" kjemiske elementer i en struktur med lav molekylvekt kunne gi motstand mot proteolyse og fordelaktig biotilgjengelighet.

Oppsummering av oppfinnelsen

I henhold til foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av trombin-inhibitorer sammensatt av to deler, en større hydrofob del og en sterkt sur del koblet sammen med en egnet linker. I sitt bredeste aspekt angår oppfinnelsen fremstilling av peptid-derivater representert ved den følgende formel (I)



hvor

X er en hydrofob gruppe;

B er en rest av en hydrofob aminosyre;

D er en lineær karbonkjede med 2 til 4 karbonatomer som kan være substituert med lavere alkyl, eller D er en p-fenylmetyl- eller en p-fenyletyl-gruppe;

Y er karbonyl;

Z er en toverdig lineær koblingsgruppe med en kjedelengde på minst 10 atomer, hvor atomet i nabostilling til karbonatomet i Y kan være usubstituert eller mono- eller di-fluor-substituert, og Z kan være sammensatt av en karbonkjede som er avbrutt av én eller flere O-, S-, NH-, karbonyl-, ester- eller amidgrupper, idet det terminale atom i kjeden er et karbonatom som er en del av karbonylgruppen som danner en peptid-binding med L- α -aminosyren G;

G og G' er like eller forskjellige og er en L- α -aminosyre med en pk-verdi på 5 eller lavere;

X' er en hydrofob L- α -aminosyre;

Q er en rest av en L- α -aminosyre eller en cyklisk L-iminosyre;

W er H, eller et forgrenet eller rettkjedet alkyl-, fenyl-

eller fenylalkyl-radikal;

R er en hydrofob gruppe omfattende 1 til 5 aminosyrer eller et alkyl-, fenyl- eller fenylalkyl-radikal som kan være substituert med en karboksyl- eller amid-funksjon, eller

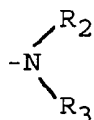
$$\begin{array}{c} \text{R er} \quad \text{Glu-Glu-Phe-Leu-R'} \\ \quad \quad \quad | \\ \quad \quad \quad \text{C} \end{array}$$
$$\text{Glu-Glu-Phe-Leu-Gln-R}'$$
$$\text{Glu-Glu-Phe-Leu-Glu-R}'$$

hvor

$$\text{C er H, OH, } -\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\underset{\underset{\text{O}}{\parallel}}{\text{S}}}-\text{OH, } -\text{CH}_2-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\underset{\underset{\text{O}}{\parallel}}{\text{S}}}-\text{OH} \text{ eller } -\text{O}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\underset{\underset{\text{O}}{\parallel}}{\text{P}}}-\text{OH, } \text{ eller } \text{CH}_2-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\underset{\underset{\text{O}}{\parallel}}{\text{P}}}-\text{OH,}$$

substituert i para-stillingen i fenyrlingen, eller

R og R' er like eller forskjellige og er en aminosyre eller en amin-gruppe med følgende formel:



hvor R_2 og R_3 er hver uavhengig hydrogen, lavere alkyl, eller fenyl, eller kan være bundet sammen for å danne en ring med 5-6 ledd, hvilken ring eventuelt kan inneholde et ytterligere heteroatom valgt fra O, S og NH, eller R' er en hydroksylgruppe bundet til Leu for å danne en karboksylgruppe, eller et terapeutisk godtagbart salt derav.

Vi har funnet at det native fragment av hirudin som omfatter restene 45-65 kan virke samtidig sammen med to uavhengige og fjerntsittende seter på trombin, idet det ene setet er det antatte anion exo-sete, mens det andre er det katalytiske sete ansvarlig for proteolyse. Denne bindingsmodus simulerer, men er forskjellig fra mekanismen til det native hirudin-molekyl som nu er vist å virke med trombins aktive sete gjennom dens N-terminale tre rester. Det synes

således som om restene 45, 46 og 47 ikke spiller en bindende rolle i det native protein, men i fravær av N-terminal-kjernen, er romlig korrekt predisponert til å samvirke, selv om det er svakt.

Basert på denne observasjon har vi syntetisert nye peptider som har modifikasjoner i begge de inhiberende bestanddelene i molekylet og som oppviser anti-trombin-aktivitet utover noen av delene alene. Videre gir kjemisk modifikasjon av den nydannede spaltbare binding, mer aktive forbindelser som har den fordel at de er proteolytisk stabile overfor trombin. Peptidene er nyttige som antikoaguleringsmidler og som inhibitorer for blodplate-aggregering, og reduserer derved risiko-faktoren ved indikasjon på arteriell trombose og andre beslektede kardiovaskulære forstyrrelser.

De antikoagulerende egenskapene til hirudin₄₅₋₆₅ er således funnet å være vesentlig forbedret ved å modifisere den N-terminale katalytiske del av N-acetyl-hirudin₄₅₋₆₅ til å omfatte en stor hydrofob del som fortrinnsvis inneholder minst én aminosyre av D-konfigurasjon, ved å innføre et ikke-proteogent pseudodipeptid, fortrinnsvis en isoster av arginyl-glycin i posisjon 47-48, og ved i det minste å opprettholde den hydrofile karakter av aminosyrene 55 til 60 i nativt hirudin ved den C-terminale ikke-katalytiske del av N-acetyl-hirudin₄₅₋₆₅.

Forbindelsene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter derfor peptider som tilsvare, men ikke er begrenset til karboksyl-regionen av hirudin som omfatter restene 45-65.

Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes for behandling av indikasjoner på trombotiske forstyrrelser. Behandlingen skjer med et preparat som omfatter en effektiv mengde av et peptid-derivat med formel I sammen med en farmasøytisk godtagbar bærer.

Denne forbindelsen kan også anvendes for å redusere reperfusjonstiden eller øke reokklusjons-tiden hos en pasient som behandles med et trombolytisk middel. En slik behandling omfatter administrering til en pasient av en effektiv mengde av et preparat som omfatter et peptid-derivat med formel I og

et trombolytisk middel sammen med en farmasøytisk godtagbar bærer.

På tegningene

Figur 1 representerer aktivert partiell tromboplastin-tid og protrombin-tid inhiberingskurver for normalt humant plasma for peptidene P53, P79, P102, P103 og r-hirudin (HV-2).

Figur 2 representerer inhibering av trombin-aktivert blodplate-aggregering ved peptid P79.

Figur 3 representerer stabiliteten til forskjellige polypeptider i plasma.

Figur 4 representerer protrombin-tid inhiberingskurver for normalt, humant plasma for peptidene P79, P184 og P185.

Foreliggende oppfinnelse illustreres bedre ved henvisning til følgende beskrivelse.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

For enkelhets skyld betegnes peptid-derivatene fremstilt ifølge oppfinnelsen herefter bare som peptider.

Betegnelsen "rest" når den anvendes om en α -aminosyre, betyr et radikal avledet fra den tilsvarende α -aminosyre ved å fjerne hydroksyl i karboksylgruppen og ett hydrogen fra α -amino-gruppen.

Forkortelsene anvendt her for å betegne de forskjellige restene er basert på anbefalingene i henhold til IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature [Biochemistry, 11, 1726-1732 (1972)]. Betegnelsen "aminosyre" anvendt her omfatter naturlig forekommende aminosyrer så vel som ikke-naturlige analoger som de som vanligvis anvendes av fagfolk innen området kjemisk syntese og peptid-kjemi. En liste over ikke-naturlige aminosyrer kan finnes i "The Peptides", vol. 5, 1983, Academic Press, kapittel 6 av D.C. Roberts og F. Vellaccio.

Betegnelsen "proteogen eller ikke-proteogen α -aminosyre" som anvendt i foreliggende søknad er ment å omfatte de amino-

syre som er vanlig anvendt blant fagfolk innen peptid-kjemi og omfatter, men er ikke begrenset til, naturlig forekommende α -aminosyrer. De naturlig forekommende aminosyrene er:

Glycin (Gly), Alanin (Ala), Valin (Val), Leucin (Leu), Isoleucin (Ile), Serin (Ser), Metionin (Met), Treonin (Thr), Fenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr), Tryptofan (Trp), Cystein (Cys), Prolin (Pro), Histidin (His), Asparaginsyre (Asp), Glutaminsyre (Glu), Asparagin (Asn), Glutamin (Gln), Arginin (Arg), Ornitin (Orn) og Lysin (Lys).

Med en hydrofob aminosyre menes vanligvis en syre som bærer en alkyl- eller aryl-gruppe bundet til α -karbonatomet. Glycin, som ikke har noen slik gruppe bundet til α -karbonatomet, er således ikke en hydrofob aminosyre. Alkyl- eller aryl-gruppene gir hydrofob karakter til aminosyren. Alkyl- eller aryl-gruppene kan være substituert, forutsatt at substituenten eller substituentene som er til stede ikke reduserer den totale hydrofobe karakter av syren. Vann-solubilisierende substituenters så som OH, COOH og NH₂ skal fortrinnsvis unngås. Eksempler på hydrofobe aminosyrer omfatter naturlige aminosyre-rester så som alanin, histidin, isoleucin, leucin, fenylalanin, tryptofan, tyrosin og ikke-naturlige aminosyrer så som de som er beskrevet i "The Peptides", Vol. 5, 1983, Academic Press, kapittel 6, av D. C. Roberts og F. Vellaccio. F.eks. kan nevnes β -(2- og 3-tienyl)alanin, β -(2- og 3-furanyl)-alanin, β -(2- og 3- og 4-pyridyl)alanin, cykloheksylalanin og SubPhe. SubPhe betyr fenylalanin-resten som har substituenters på den aromatiske ringen. Substituenters som er vanlig anvendt av fagfolk innen aminosyre-kjemi er halogener (fluorid, bromid, klorid), elektrontiltrekkende grupper (NO₂) eller lavere alkyl- eller aryl-substituenters i 2-, 3- eller 4-stilling. Det skal bemerkes at, hvis ikke annet er angitt, er aminosyrene anvendt i forbindelse med foreliggende oppfinnelse de som er i L-konfigurasjon.

Betegnelsen "alkyl" som anvendt her betyr alkyl-radikaler med fortrinnsvis fra 1 til 6 karbonatomer, og omfatter f.eks. metyl, etyl, propyl, butyl. Når annet ikke er angitt, kan alkylgruppene som inneholder 3 eller flere karbonatomer, være

forgrenede eller lineære.

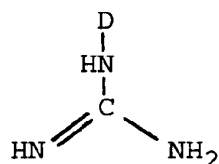
En foretrukket gruppe peptider er representert ved formel I hvor

X er en hydrofob α -aminosyre i D-konfigurasjon. Syren X er bundet ved en peptid-binding til α -aminosyren B. Alternativt er X en annen stor hydrofob gruppe som vil bindes til nitrogenatomet i α -aminogruppen av syren B, så som en aryl-sulfonylgruppe;

B er en rest av en hydrofob α -aminosyre i L-konfigurasjon eller en cyklisk imino-syre, som kan ha én eller flere alkyl-substituenten bundet til ringen, hvilke substituenten kan danne en bro for å danne en cyklisk struktur;

D er p-fenylmetyl, p-fenyletyl etylen, butylen eller propylen,

Viktige aspekter ved gruppen

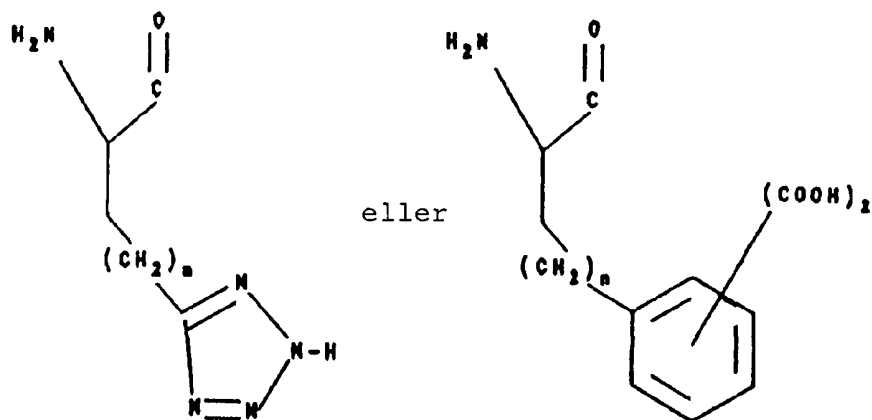


er dens lengde og dens basisitet. Hvis det ved syntesen av en forbindelse med formel I anvendes L-arginin, vil det oppnås en forbindelse med formel I med den ønskede stereokjemi hvor D er 1,3-propylen. Hvis L-homoarginin anvendes, vil det oppnås en forbindelse hvor D er 1,4-butylen. Hvis L-norarginin anvendes, vil det oppnås en forbindelse hvor D er 1,2-etylen. Hvis 4-guanidyl-L-fenylalanin anvendes, vil det oppnås en forbindelse hvor D er en p-fenylmetyl-gruppe. Hvis 4-guanidyl-L-homofenylalanin anvendes, vil det oppnås en forbindelse hvor D er en p-fenyletylgruppe;

Y er karbonyl;

Z har en kjedelengde mellom 12 og 40, og fortrinnsvis 20 atomer;

G og G' er Asp, Glu,



hvor n er 1 eller 2,

X' er L-Phe, L-4FPhe eller L-4ClPhe;

Q er prolin, pipekolinsyre, sarcosin eller Glu;

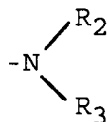
W er H eller en lavere alkyl-, fenyl- eller fenylalkyl-substituent i 3-, 4- eller 5-stillingen til piperidin- eller pyrrolidin-ringen;

R er Glu-Glu-Phe-Leu- R' eller Leu- R' , hvor

C er H, $-\text{CH}_2-\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$, $-\text{OH}$, $-\text{O}-\text{S}(=\text{O})_2\text{OH}$ eller $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})_2\text{OH}$, eller $\text{CH}_2-\text{P}(=\text{O})_2\text{OH}$,

substituert i para-stilling

og R' er en hydroksylgruppe eller



hvor R_2 og R_3 er en lineær eller forgrenet alkylkjede med 1 til 6 karbonatomer og kan være bundet sammen for å danne en ring med 5-6 ledd.

En mer foretrukket gruppe peptider representeres av formel I hvor

X er D-Phe, D-4FPhe eller D-4ClPhe hvor α -aminogruppen er nøytralisert ved acetylering eller benzoylring, eller X er naftalensulfonyl, benzensulfonyl, toluensulfonyl;

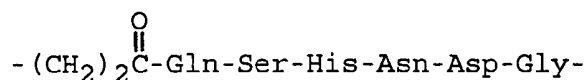
B er Val, pipekolinsyre eller Pro;

W er hydrogen eller en lavere alkyl-, fenyl- eller fenylalkyl-substituent i 3-, 4- eller 5-stilling i ringen når B er Pro eller pipekolinsyre;

D er propylen eller fenylmetyl;

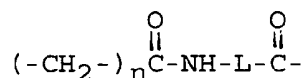
Y er karbonyl;

Z er



hvor

n er et helt tall fra 1 til 4, den native hirudin⁴⁸⁻⁵⁴ sekvens, eller en syntetisk spanner med den generelle formel

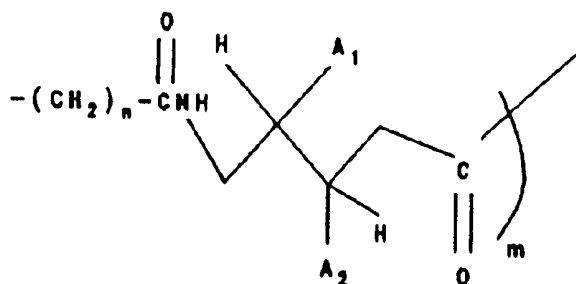


hvor

n er et helt tall fra 1 til 4; og

L er et heksapeptid eller mettet eller umettet alkyl-kjede svarende til 18 atomer eller mindre av et heksapeptid.

Fortrinnsvis har koblingsgruppen Z den følgende formel

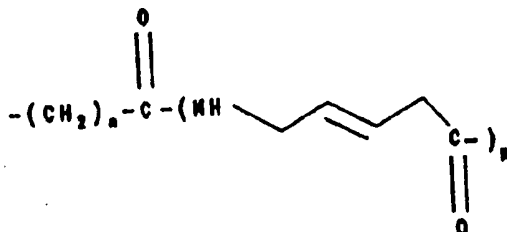


hvor

n og m er et helt tall fra 1 til 4; og

A_1 , A_2 er hver uavhengig H eller des H i cis- eller trans-konfigurasjon, med det forbehold at når m er 1, er n 3 eller 4;

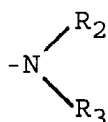
hvis A_1 , A_2 er des H, er Z



hvor

n og p er hele tall fra 1 til 4. Koblingsgruppen som skal anvendes i forbindelse med foreliggende oppfinnelse må således ha tilstrekkelig lengde til å la peptidene med formel I samvirke med to forskjellige og uavhengige bindingsseter adskilt med en kritisk avstand (ca. 15Å) fra hverandre på trombin-overflaten. Z er derfor en linker hvis kumulative antall atomer som omfatter enheten er det samme som antallet atomer svarende til aminosyre-sekvensen til hirudin⁴⁹⁻⁵⁴ eller lavere; og

R er Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH, Leu-OH eller Glu-Glu-Tyr-Leu-R' hvor R' er en hydroksylgruppe eller en gruppe med følgende formel:



hvor

R₂ er -CH₃ eller fenetyl,

R₃ er H eller -CH₃ eller R₂ og R₃ kan være bundet sammen for å danne -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂- eller -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-.

En enda mer foretrukket gruppe av forbindelsene med formel I er de hvor

X er D-Phe;

B er prolin;

D er propylen;

Y er karbonyl;

G er Asp;

G' er Glu;

X' er Phe;

Q er Glu eller Pro;

Z er $-(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{Gln}-\text{Ser}-\text{His}-\text{Asp}-\text{Asp}-\text{Gly}-$,

$-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{Gln}-\text{Ser}-\text{His}-\text{Asp}-\text{Asp}-\text{Gly}-$,

$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{Gln}-\text{Ser}-\text{His}-\text{Asp}-\text{Asp}-\text{Gly}-$,

$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C})$,

$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C})_2$, eller

$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C})_3$;

W er H, n-butyl eller metyl; og

R er Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH; eller -Leu-OH.

Det er funnet at kortere peptider, f.eks. "avkortede" peptider som mangler aminosyrene Glu⁶¹, Glu⁶², Tyr⁶³ og Gln⁶⁵ i nativt hirudin oppviser interessante biologiske egenskaper. De "avkortede" peptidene oppviser bedre biotilgjengelighet eftersom kortere molekyler er mindre tilbøyelige til å forårsake immun-reaksjoner og mindre tilbøyelige til å gjennomgå proteolyse. Administrering av kortere peptider med lavere molekylvekt er også lettere og absorpsjonen er vanligvis bedre enn for lenger peptider. Det skal også bemerkes at anvendelse av en syntetisk koblingsgruppe videre hindrer nedbrytning av peptidet ved proteolyse.

Syntese ifølge foreliggende oppfinnelse av peptid-derivatene med formel I

Peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse kan syntetiseres under anvendelse av en rekke metoder som er velkjent for fagfolk på området. F.eks. kan peptidene syntetiseres ved fast-fase-metoden slik som den som er beskrevet av Stewart et al. i "Solid phase peptide synthesis", Freeman & Co., San Francisco, 1969 på en passende peptid-synthesizer.

I noen tilfeller kan imidlertid regionene (i), (ii) eller (iii) av peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse være en syntetisk del for hvilken kjemisk syntese er nødvendig før kobling av denne delen med andre aminosyrer for å gi det ønskede peptid ved hjelp av konvensjonell fast-fase-syntese. Eksemplene 1 til 6 senere i beskrivelsen illustrerer den type kjemisk syntese som er nødvendig for å syntetisere en av de foretrukne utførelsesformer i region (i) mens eksempel 7 beskriver syntese av en syntetisk koblingsgruppe som skal anvendes i region (iii). Det vil være klart for fagfolk at en kjemiker utdannet innen organisk kjemi lett kan fremstille den kjemiske gruppen som kan være nødvendig for regionene (i), (ii) og (iii) av peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse.

Noen av peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelsen ble spesielt syntetisert på en Applied Biosystems 430A peptid-synthesizer. BOC-GlnPAM-harpiks (Applied Biosystems, 0,64 mmol/gram) ble anvendt som fast-fase bæreren. Aminosyre-kobling ble mediert ved dicykloheksylkarbodiimid/N-hydroksybenzoltriazol og avbeskyttelse ble utført med 50% trifluoreddiksyre (TFA) i metylenklorid i 3 minutter, fulgt av en ytterligere 20 minutter cyklus. Sidekjede-beskyttende grupper var som følger: Asp(Chx), Glu(Bzl), His(Bom), Arg(Tos), Tyr(2-BrZ), Ser(Bzl). Den fullt beskyttede peptid-harpiks ble derefter behandlet med flytende hydrogenfluorid inneholdende anisol og dimetylsulfid (10% etter volum) ved -5°C i 60 minutter. Overskudd av HF ble fjernet under en strøm av nitrogen, og det gjenværende faste stoff ble ekstrahert med

eter og filtrert. Harpiksen ble ekstrahert tre ganger med iseddik og vann fulgt av lyofilisering.

Rensning og analyse av de syntetiske peptider

De resulterende lyofiliserte urensede peptider kan renses til homogenitet under anvendelse av generelt aksepterte peptid-renseteknikker. En egnet teknikk er revers fase kromatografi på en Vydac octadecyl silika glasskolonne (15Å, 1,5 x 30 cm, 40 psi) under anvendelse av en lineær gradient av oppløsningsmiddelsystemet: A, 500 ml 500 ml 0,1% TFA/H₂O og B, 1l 60% acetonitril/H₂O inneholdende 0,1% TFA. Fraksjonene analyseres ved revers fase HPLC på en Varian LC under anvendelse av en Vydac C₁₈ analytisk kolonne og 215 nm deteksjon. Fraksjoner med over 99% renhet samles og lyofiliseres. Peptid-innholdet bestemmes ved aminosyre-analyse på en Beckman model 6300 aminosyre-analysator. Prøver ble derefter tørret i en Waters Pico-Tag Work Station. Konstant kokende HCl (200 µl) inneholdende 1% fenol ble satt til kolben og alternativt spylt (med tørr nitrogen) og evakuert etter tre skyllinger. Endelig ble kolben inneholdende prøven oppvarmet ved 150°C i 1 time under vakuum. Masse-spektralanalyse ble utført på et SCIEX API III spektrometer utstyrt med ionspray-innløpskilde.

Strukturen og sekvensen til peptidene syntetisert ifølge foreliggende oppfinnelse kan således bekreftes ved korrekt aminosyre-sammensetning og masse-spektra for å vise overensstemmelse med den beregnede molekylvekt.

De følgende eksempler er gitt for å illustrere heller enn å begrense omfanget av foreliggende oppfinnelse.

Forkortelser anvendt i eksemplene omfatter BOC, tert-butoksykarbonyl; Tos, p-toluensulfonyl; CH₂Cl₂, metylenklorid; TEA, trietylamin; BOP, benzotriazolyl-N-oksytrisdimetylamino-fosfoniumheksafluorfosfat; DMF, dimetylformamid; EtOAc, etylacetat; DCC, N,N'-dicykloheksylkarbodiimid; DPPA, difenyl-fosforylazid; THF, tetrahydrofuran; HF, hydrogenfluorid, CBZ, benzyloksykarbonyl.

Eksempel 1

Syntese av (2S)-2-(BOC)-N-metoksy-N-metyl-5-tosylguanidino-pentanamid

Til en oppløsning av N^α-BOC-N^G-Tosyl-Arginin (428 mg, 1 mmol) i 30 ml DMF ved 0°C i et isbad, inneholdende TEA (0,4 ml, 3 mmol) og N,O-dimetylhydroksylamin-hydroklorid (146 mg, 1,5 mmol) ble satt BOP reagens (500 mg, 1,1 mmol) (B. Castro, J. R. Dormoy, G. Elvin, C. Selve, Tetrahedron Letters # 14, s. 1219-1222, 1975). Reaksjonen ble omrørt i 15 timer ved 4°C hvorefter oppløsningsmidlet ble avdampet under høyvakuum. Residuet ble oppløst i 50 ml EtOAc og vasket med H₂O. Den organiske fasen ble ytterligere ekstrahert med 5% NaHCO₃ (3 ganger), 1N HCl (3 ganger) og tørret over Na₂SO₄. Opp-løsningsmidlet ble filtrert over celite og konsentrert i vakuum. Tilsetning av en liten mengde heksan til konsentratet utfelte et hvitt, fast stoff (500 mg) svarende til tittel-forbindelsen. Masse-spektralanalyse: M/Z = 472 (M+H)⁺

Eksempel 2

Syntese av 6-BOC-9-tosylguanidino-1-nonen-5-on

Til en oppløsning av produktet fra eksempel 1 (600 mg, 1,3 mmol) i 25 ml THF ble satt 10 ekvivalenter Grignard-reagens fremstilt fra 4-brom-1-buten (Bemerk ved fremstilling: 312 mg magnesiumspon (13 mmol) i 50 ml vannfri eter ble behandlet dråpevis med 1,75 g 4-brom-1-buten for å opprettholde svakt tilbakeløp), etter fullstendig forbruk av metallet ble Grignard-oppløsningen overført ved hjelp av sprøyte under argon, til THF-blandingen. Hele THF-blandingen ble kjølt med vandig NH₄Cl etter at TLC viste at utgangsmaterialet var forsvunnet (TLC ble utført på Kieselgel 60F 254, Merck, glass-plater). Fasene ble separert, og den organiske fase ble videre vasket med 1N HCl og H₂O, tørret (Na₂SO₄) og inndampet under vakuum. Kromatografi på silikagel (under eluering med 4:1 EtOAc/heksan ga en klar olje svarende til tittelforbindelsen. Masse-spektralanalyse M/Z = 469 (M+H)⁺.

Eksempel 3

Syntese av 5-BOC-4-okso-8-tosylguanidinooktansyre.

Produktet fra eksempel 2 (2,5 g, 5,3 mmol) ble oppløst i 50 ml acetonitril fulgt av tilsetning av natriumperjodat (8 g, 37,5 mmol) oppløst i 50 ml vann. Hele blandingen ble behandlet med 100 mg rutheniumklorid. Etter 1 times kraftig omrøring ved romtemperatur ble ikke noe utgangsmateriale observert ved TLC. Blandingen ble fortynnet med 100 ml H₂O og 100 ml eter. Fasene ble separert, og den vandige fasen ble videre ekstrahert med eter. De samlede organiske ekstrakter ble vasket med H₂O, tørret (Na₂SO₄) og inndampet til tørrhet for å gi 1,5 g av et skum svarende til tittelforbindelsen. $M/Z = 485 (M+H)^+$.

Eksempel 4

Syntese av 6-BOC-5-okso-9-tosylguanidinononansyre

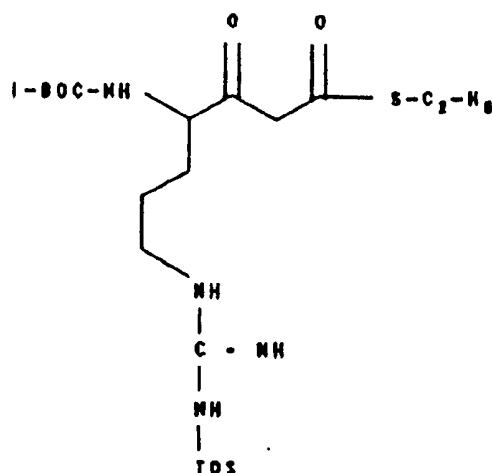
Tittelforbindelsen i dette eksempel ble syntetisert analogt med eksemplene 1 til 3. Kort sag ble produktet fra eksempel 1 omsatt med et Grignard-reagens fremstilt fra magnesium og 5-brom-1-penten. Det resulterende addukt, isolert som en olje analogt med eksempel 3, ble derefter behandlet med en kombinasjon av natriumperjodat og rutheniumklorid for å gi tittel-homologen i dette eksempel. $M/Z=499 (M+H)^+$.

Eksempel 5

Syntese av 7-BOC-6-okso-10-tosylguanidinodekansyre

Tittelforbindelsen i dette eksempel ble fremstilt analogt med eksemplene 1 til 4. I dette eksempel ble produktet fra eksempel 1 omsatt med Grignard-reagenset fremstilt fra magnesium og 6-brom-1-heksen. Etter isolering av adduktet ved silikagel-kromatografi som beskrevet i eksempel 2, ble adduktet omsatt med natriumperjodat og rutheniumklorid. Isolering av produktet ga tittelforbindelsen som en olje. $M/Z = 513 (M+H)^+$.

Eksempel 6



Etyl; 4N-t-BOC-3-okso-7-tosylguanidin-tioheptanoat
(blandet anhydridmetode).

Dannelse av blandet anhydrid: Til en omrørt oppløsning av 1 g (2,4 mmol) (L)-N^α-BOC-Arg(N^W)TOS)OH og 0,66 ml (0,48 mmol) trietylamin i 15 ml vannfri tetrahydrofuran ved -20°C ble dråpevis satt 0,40 ml (0,3 mmol) isobutylklorformiat i løpet av 15 minutter. Etter 1 time ble blandingen fortynnet med 15 ml eter og det utfelte faste stoff ble frafiltrert. Filtratet inneholdende det blandede anhydrid ble lagret ved 0°C.

En omrørt oppløsning av diisopropylamin (3,4 ml, 24 mmol) i 25 ml vannfri eter under argon ved 0°C ble imens dråpevis behandlet med én ekvivalent N-But-Li i THF i løpet av 30 minutter. Deretter ble reaksjonsblandingen avkjølt til -60°C og behandlet med 2,5 ml etyltioacetat. Etter omrøring ved -60°C i 30 minutter ble blandingen behandlet med 6 g MgBr₂-eterat og omrørt i ytterligere 30 minutter. Endelig ble denne blandingen behandlet med det fordannede blandede anhydrid, og omrøring ble fortsatt i 5 timer inntil omsetningen var fullstendig ved HPLC.

Reaksjonsblandingen ble dråpevis behandlet med 6M NH₄Cl, og fasene ble separert. Den organiske fasen ble fortynnet med 50 ml EtOAc og ekstrahert med INHCl (3 x), H₂O (3 x), tørret med Na₂SO₄ og inndampet under høyvakuum for å gi tittel-

forbindelsen som en olje $M/Z = 515 (M + H)^+$.

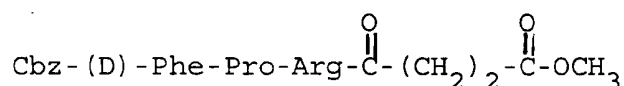
Eksempel 7

Kobling av tioesteren fra eksempel 6 med α -aminosyre-estrene og avbeskyttede aminoacyl-polystyren-harpikser.

Det beskyttede arginyl-staton fra eksempel 6 (2 ekvivalenter) ble oppløst i CH_2Cl_2 og satt til en blanding av α -aminosyre-ester (1 ekvivalent) eller polystyren-harpiks inneholdende den voksende polypeptid-kjeden. Til denne blandingen ble satt kobber(I)jodid (2 ekvivalenter) og trietylamin (2 ekvivalenter). Reaksjonen ble overvåket ved HPLC for aminosyre-esteren eller ved konvensjonell ninhydrin-test for polystyren-bundne peptider.

Eksempel 8

Syntese av peptidet med formelen

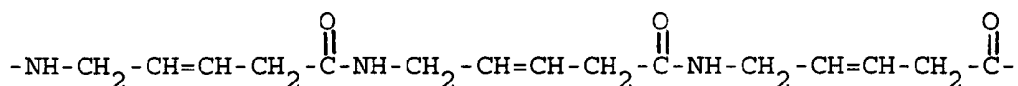


Aminosyren fra eksempel 3 (200 mg, 0,4 mmol) ble oppløst i 10 ml EtOAc og behandlet med en eterisk oppløsning av diazometan inntil gass-utvikling opphørte. Den således dannede metylester ble isolert ved inndampning og avbeskyttet med 10 ml 50% TFA/ CH_2Cl_2 ved 0°C i 1 time. Avdampning av oppløsningsmidlet under høyvakuum ga 200 mg av en viskøs olje som motsto krystallisering og ble anvendt direkte. Den oppnådde oljen (200 mg, 0,33 mmol) ble oppløst i 20 ml DMF avkjølt i et isbad og behandlet med 158 mg (0,4 mmol) Cbz-(D)-Phe-Pro-OH, 0,14 ml (1 mmol) TEA og 110 mg (0,4 mmol) DPPA. Hele oppløsningen fikk stå ved 4°C i 15 timer og ble inndampet under høyvakuum. Residuet ble fordelt mellom vann og EtOAc og fasene ble separert. Den organiske fasen ble videre behandlet som beskrevet i eksempel 3, og etter avdampning av oppløsningsmidlet ble det oppnådd et residuum som ble renset ved silikagel-kromatografi (150 mg).

De beskyttende gruppene ble fjernet ved behandling av peptidet med flytende hydrogenfluorid ved 0°C i 1 time. Etter avdampning av overskudd av HF ble residuet oppløst i 50 ml 10% AcOH og ekstrahert med eter (3 ganger). Den vandige fasen ble lyofilisert for å gi et pulver svarende til tittelforbindelsen i dette eksempel. $M/Z = 489,2 (M+H)^+$.

Eksempel 9

Fremstilling av underenheten av den syntetiske spacer med formel II



Syntesen ble innrettet etter (Cox M.T., Heston D.W. og Horbury J., J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1980, 799-800) med store modifikasjoner. Den fullstendige fremgangsmåte beskrives som følger.

a) Syntese av trans-β-hydromukonsyre-dimetylester

22 g (153 mmol) trans-β-hydromukonsyre ble oppløst i 200 ml benzen inneholdende 500 mg p-toluen-sulfonsyre og 100 ml metanol. Oppløsningen ble holdt ved tilbakeløp i 6 timer og behandlet med 100 ml vann. Fasene ble separert, og det organiske lag ble videre ekstrahert med 5% NaHCO₃ og H₂O. Etter tørring (Na₂SO₄) ble oppløsningsmidlet avdampet under vakuum, og residuet ble destillert (83-85°C 0,5 mm Hg) for å gi 19 g av tittelforbindelsen.

b) Syntese av trans-β-hydromukonsyre-monometylester.

5 g (27,5) mmol) av produktet fra trinn a) ble suspendert i 100 ml av en oppløsning av 0,1M KH₂PO₄ fulgt av tilsetning av 20 mg svinelever-esterase. pH av oppløsningen ble holdt på 7 ved dråpevis tilsetning av en oppløsning av 1M NaOH. Etter tilsetning av 1M NaOH svarende til 1 molekvivalent av di-

esteren, ble oppløsningen behandlet med trekull, omrørt i 5 minutter og filtrert over celite. Filtratet ble ekstrahert med eter og de samlede organiske ekstrakter ble kastet. Den vandige fasen ble surgjort med 3N HCl og ekstrahert påny med eter. De samlede eteriske ekstrakter ble tørret (Na_2SO_4) og inndampet i vakuum. Residuet ble destillert under redusert trykk ($105-110^\circ\text{C}$, 0,5 mmHg) som ga 4 g av en olje svarende til tittelforbindelsen.

c) Syntese av 4-metoksykarbonyl-2-dehydro-butyl-isocyanat

1,22 g (7,3 mmol) av monoesteren fra trinn b) ble oppløst i 25 ml benzen. 0,76 ml (8,7 mmol) oksalyklorid ble dråpevis tilsatt i løpet av 15 minutter, og oppløsningen ble kraftig omrørt i 3 timer. Oppløsningen ble inndampet under vakuum. Residuet oppløst i 10 ml aceton ble satt til en forhånds-avkjølt oppløsning (0°C) av natriumazid, 1 g i 20 ml 50% vann/aceton. Etter 30 minutter ble blandingen fortynnet med vann (50 ml) og ekstrahert 3 ganger med 20 ml porsjoner av benzen. De samlede organiske ekstrakter ble tørret (Na_2SO_4) og filtrert. Filtratet ble oppvarmet i et oljebad ved 80°C inntil ingen ytterligere nitrogenutvikling ble observert. Oppløsningsmidlet ble avdampet under vakuum, og residuet destillert under redusert trykk ($80-85^\circ\text{C}$, 0,5 mm Hg) for å gi 700 mg av tittel-forbindelsen.

d) Syntese av 4-N-butyloksykarbonyl-pent-3-en-syre.

Tert-butanol, 890 mg (12,2 mmol), ble satt til en oppløsning inneholdende produktet fra trinn c) (1 g, 6,1 mmol) i 25 ml benzen. Hele oppløsningen ble tilbakeløpsbehandlet i 10 timer, hvorefter den ble inndampet under vakuum. Residuet ble behandlet med svinelever-esterase som beskrevet i trinn b) og opparbeidet som beskrevet i det trinnet for å gi 700 mg av tittelforbindelsen.

Produktet fra trinn d) anvendes derefter som en enhet for fremstillingen av den syntetiske spacer II. Disse enhetene

blir satt sammen for å danne spacer (II) under anvendelse av teknikker som er velkjent for fagfolk på området.

Eksempel 10

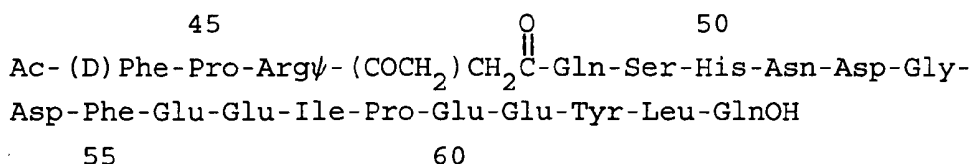
Syntese av forskjellige peptider.

Peptidene P24, P51, P53, P73, P52 og P54, som er vist i tabell I nedenfor, ble syntetisert under anvendelse av standard metoder beskrevet tidligere under overskriften "Syntese av peptider". Også peptid P79, svarende til det syntetiske peptid med formel I hvor

X er D-Phe, Z er $(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-$, D er propyl, Y er $-\text{CO}$, W er H og R er $-\text{Glu-Gly-Tyr-Leu-Gln-OH}$ ble fremstilt ved først kjemisk å syntetisere 5-BOC-4-okso-8-tosylguanidinooktansyre som beskrevet i eksempel 3, fulgt av passende peptid-sammensetning under anvendelse av metoden beskrevet under overskriften "Syntese av peptider".

Eksempel 11

Fremstilling av P79.



1 g tert-butyloksykarbonyl-Gln-fenylacetamidometyl-harpiks (Applied Biosystems, 0,64 mmol/g) ble ført gjennom 16 cykler av syntese innbefattet α -sidekjede avbeskyttelse (50% TFA i CH_2Cl_2 og kobling under anvendelse av 2,5 meq. beskyttet aminosyre/DCC og N-hydroksybenzotriazol. Sidekjede-beskyttende grupper på standard aminosyrer var som følger: Asp (cykloheksyl), Glu (benzyl), His (benzyloksymetyl), Tyr (brombenzyl), Ser (benzyl).

Den syntetiske beskyttede aminosyre fra eksempel 3 ble koblet til Gln⁴⁹ under anvendelse av DCC/N-hydroksybenzotriazol. For optimale resultater kan N-BOC-(D)-Phe-Pro-OH

tilsettes som en enkelt enhet istedenfor som individuelle aminosyrer.

Den fullt beskyttede peptid-harpiks (500 mg) ble behandlet med hydrogenfluorid i et teflon-kar inneholdende anisol og dimetylsulfid (10% etter volum) ved -5°C i 60 minutter. Overskudd av HF ble fjernet under en strøm av N_2 , og den gjenværende massen ble ekstrahert med eter og filtrert. Harpiksen ble ekstrahert tre ganger med iseddik og vann, fulgt av lyofilisering.

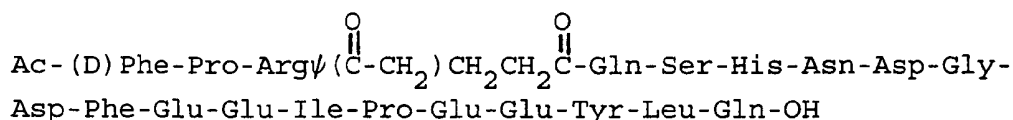
Det lyofiliserte urensede peptid ble renset til homogenitet ved revers fase kromatografi på oktadecyl-silika (15Å, Vydac) glasskolonne (1,5 x 30 cm), 40 psi under anvendelse av en lineær gradient av et oppløsningsmiddelsystem bestående av (a) 500 ml 0,1% TFA/ H_2O og (B) 1 liter 60% acetonitril H_2O inneholdende 0,1% TFA. Fraksjonene svarende til 98% renhet eller høyere ble samlet og lyofilisert.

Aminosyre-analyse indikerte: Asp (3), Ser (1), Glu (6), Gly (1), Ile (1), Leu (1), Tyr (1), Phe (2), His (1), Pro (2).

Det resulterende peptid viste et pseudo-molekylært ion svarende til 2548,6.

Eksempel 12

Fremstilling av P102

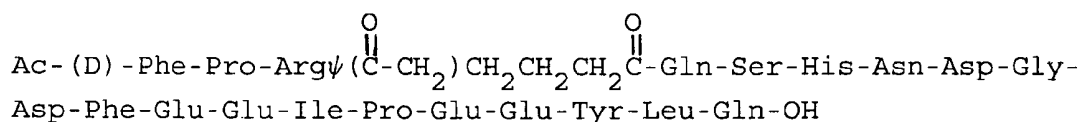


Aminosyre-analyse indikerte: Asp (3,20), Ser (0,86), Gly (6,60), Gly (0,8), Ile (1,00), Leu (1,06), Tyr (0,86), Phe (1,84), His (0,88), Pro (2,10).

Pseudo-molekylært ion: 2562,4.

Eksempel 13

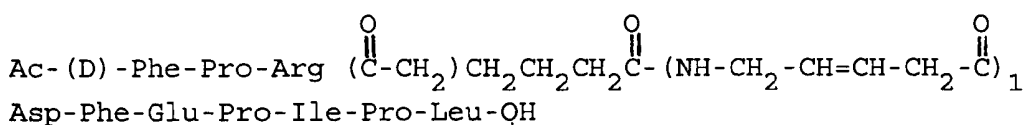
Fremstilling av P103



Aminosyre-analyse indikerte: Asp (3,15), Ser (0,84), Gly (6,84), Gly (1,00), Ile (1,04), Leu (1,26), Tyr (0,99), Phe (2,12), His (1,00), Pro (1,55).
Pseudo-molekylært ion: 2576,8.

Eksempel 14

Fremstilling av P183

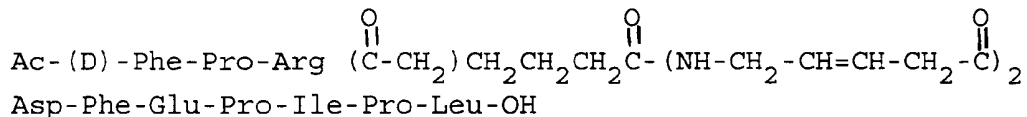


Tittelpeptidet i dette eksempel ble syntetisert og renset i det vesentlige som beskrevet for P79 og dens homologer med mindre modifikasjoner. Fast-fase syntesen begynte f.eks. med tert-butyloksykarboonyl-Leu-fenylacetamidometyl-polystyren-harpiks (Applied Biosystems, 0,64 mmol/g). For avbeskyttelse av t-BOC-gruppen etter Asp-resten ble 50% TFA i CH_2Cl_2 inneholdende 10% etylmetylsulfid anvendt. På denne måten ble utbyttet av tittel-peptidet optimert til over 60%, ved HPLC (UV absorpsjon ved 215 nm).

Aminosyreanalyse indikerte: Asp (1,00), Glu (1,07), Ile (0,94), Leu (1), Phe (1,82), Pro (3,29).
Pseudo-molekylært ion: 1455.

Eksempel 15

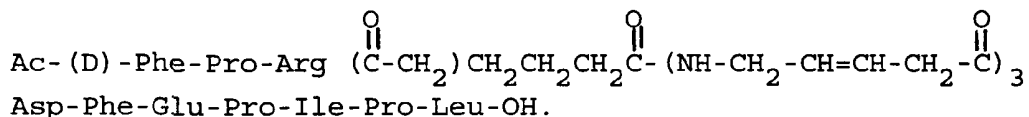
Fremstilling av P184



Aminosyre-analyse indikerte: Asp (1,00), Glu (1,08), Ile (0,96), Leu (1,01), Phe (1,91), Pro (3,48).
Pseudo-molekylært ion: 1553

Eksempel 16

Fremstilling av P185



Aminosyre-analyse indikerte: Asp (1,00), Glu (1,06), Ile (0,93), Leu (0,98), Phe (1,88), Pro (3,6).

Pseudo-molekylært ion: 1647.

Amidolytisk forsøk på trombin-aktivitet

Trombin-katalysert hydrolyse av Tos-Gly-Pro-Arg-pNA ble overvåket ved 405 nm på en Varian Cary 2000 dobbel-stråle spektrofotometer under anvendelse av substrat-konsentrasjoner på 2,5, 3,5, 5 og 10 μM i et endelig volum på 1 ml. De hydrolytiske reaksjoner ble utført ved 25°C i 0,1M tris-HCl-buffer, pH 7,8, inneholdende 0,1M NaCl og 0,1% PEG 6000. Reaksjonene ble initiert ved tilsetning av substratet oppløst i 0,1M tris-HCl buffer, pH 7,8 til en preinkubert oppløsning av enzym (0,4 eller 0,04 nM) og variable konsentrasjoner av inhibitor oppløst i samme buffer. Opprinnelig hastighet ble nedtegnet, og K_i -verdier ble bestemt grafisk ved belastet lineær regresjon av Dixon-plottet i tilfelle av kompetitiv inhibering, eller ved metoden til Baici (Baici, 1981) for hyperbolsk inhibering. Fluorogene undersøkelser ble utført under anvendelse av samme betingelser og instrumenter som ovenfor ved å arbeide i fluorescens modus i forholdet $\lambda_{\text{ex}}=383 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=455 \text{ nm}$). Fluorescens-intensitet ble kalibrert med 7-amino-4-metylkumarin-oppløsning av kjent konsentrasjon. Spesifisiteten til syntetiske peptider ifølge foreliggende oppfinnelse overfor α -trombin kan også bestemmes ved å sammenligne deres relative inhiberende aktiviteter mot både humant α -trombin og bovint α -trombin og trypsin ved å sammenligne K_1 -verdiene oppnådd ved den amidolytiske undersøkelse på trombin-aktivitet.

Den inhibitoriske aktiviteten til de syntetiske peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse overfor trombin kan

således også undersøkes ved bestemmelse av protrombin-tid (PT, ytre vei) eller aktivert delvis tromboplastin-tid (APTT, indre vei) av samlet rekonstituert normalt humant plasma under anvendelse av Coag-A-Mate 2001 instrument (General Diagnostics Inc., Morris Plains, New Jersey) eller annet egnet spektrofotometer. For bestemmelse av protrombin-tid, blandes således 50 μ l rekonstituert citrert normalt humant plasma (Sigma, St-Louis, MO) med 50 μ l tromboplastin-oppløsning ved 37°C i en 400 μ l skål. Blandingen behandles derefter enten med 200 μ l tris-HCl-buffer pH 7,8 (inneholdende 0,1M NaCl, 0,1% PEG 6000) eller variable konsentrasjoner av inhibitor i samme buffer. Pluggdannelsesestiden nedtegnes efter forkalkning påny med 100 μ l 25 mM CaCl_2 . Pluggdannelsesestiden ved fravær av inhibitor var mellom 19-22 sekunder.

Samme metode anvendes for bestemmelse av aktivert partiell tromboplastin-tid, bortsett fra at rekonstituert plasma aktiveres i 3 minutter med cefalin (Sigman, St-Louis, MO).

Typiske APTT og PT inhiberingskurver er vist på figurene 1 og 4.

Den hemmende aktiviteten til noen av peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse overfor trombin reflekteres ved deres evne til å hemme trombin-mediert blodplateaggregering som vist på Figur 2. Blodplaterikt plasma inneholdende forskjellige konsentrasjoner av P79 behandles med trombin. Blodplate-aggregering, reflektert ved øket lys-transmisjon som måles på et Bio Data PAP-4 aggregometer.

Fibrinogen pluggdannelses-forsøk

Inhibering av fibrinogen pluggdannelse ble målt spektrofotometrisk ved 405 nm på Varian DMS 90 ved 37°C. 300 μ L 0,1% fibrinogen (Sigma) i 0,1M tris-HCl, pH 7,8, inneholdende 0,1M NaCl, 0,1% PEG 600 og forskjellige konsentrasjoner av inhibitor i samme buffer ble blandet i polystyren-skåler, og reaksjonen ble startet ved tilsetning av enzymet (humant eller bovin α -trombin 0,4 nM) i et totalt volum på 1 ml. Tiden fra blanding til bøyning på grunn av pluggdannelse ble nedtegnet for forskjellige inhibitor-konsentrasjoner, og IC_{50} -verdier

ble beregnet ved log probit analyse. Konsentrasjonene av inhibitorene i forsøkene var basert på peptid-innholdet.

Forskjellige andre forsøk kan anvendes for å bestemme den antikoagulerende aktiviteten til peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse. Den inhiberende aktiviteten til de syntetiske peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse overfor trombin kan således også undersøkes ved inhibering av aktiverte partielle tromboplastin-tider (APTT indre vei eller protrombin-tid PT ytre vei). Antikoaguleringsaktiviteten kan således bestemmes ved å undersøke APTT for samlet, normalt humant plasma med et Coag-A-Mate 2001 instrument (General Diagnostics Inc., Morris Plains, New Jersey).

Videre kan de syntetiske peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse undersøkes på inhibering av trombin-katalysert hydrolyse av tripeptidyl P-nitroanilid-substrat tosyl-Gly-Pro-Arg-P-nitroanilid (Chromozym TH, Boehringer-Mannheim, Indianapolis, In.) spektrofotometrisk ved 420 nm på et Cary 219 doublebeam spektrofotometer. Reaksjonene kan frembringes ved å blande en trombin-oppløsning med tris-HCl, pH 7,4, NaCl buffer.

Disse undersøkelsene, utført under anvendelse av noen av de syntetiske peptider fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse, demonstrerte at disse peptidene virker som bifunksjonelle inhibitorer av trombin. Det ble demonstrert at innføring av de to kritiske regioner av peptidene adskilt av en egnet spacer, ga sterke trombin-inhibitorer. Resultatene er vist i tabell I.

Den forbedrede enzym-affinitet og in vitro anti-koagulerende virkning, kan derfor direkte tilskrives en kooperativ intramolekylær bindings-mekanisme. Hvis f.eks. substituent X i forbindelsen med formel I er D-Phe, vil denne gjøre region (i) egnet til å bindes til den utstrakte hydrofobe region av det aktive sete til trombin. Betingelsene for at region (ii) bindes til et ikke-katalytisk sete på trombin er forskjellige fra de for region (i).

Det er klart at innføring av disse to regioner i et enkelt molekyl separert ved en egnet linker (koblingsgruppe)

øker vesentlig affiniteten av forbindelsene til trombin. Kombinasjonen av separate IC_{50} -doser av de to uavhengige regioner resulterer faktisk i nøyaktig dobling av sammenklumpningstiden mens større aktivitet oppnås hvis de to regioner bindes sammen med en linker. Det synes derfor som om dobbel kooperativ binding av de bifunksjonelle inhibitorer fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse finner sted når disse kommer i kontakt med trombin. Linkeren tjener som en egnet spacer for å danne bro mellom et hjelpe-sete (region (ii)) og et katalytisk sete (region (i)) så vel som et apolart bindingssete ved siden av det katalytiske sete.

De forskjellige forsøkene har også vist at mens D-Phe-Pro-Arg-Pro-OH og N α -acetyl-desulfo-hirudin⁵⁵⁻⁶⁵ uavhengig inhiberte fibrin-klumpdannelse av bovint α -trombin med IC_{50} -verdier på henholdsvis 250 μ M og 3,5 μ M, ga innføring av disse i ett enkelt molekyll, separert med en spacer svarende til hirudin-restene 49-54, en inhibitor med en $IC_{50} = 70 \pm 20$ nM (bovint α -trombin) og $4 \pm 0,8$ nM (humant α -trombin). Virkningen ved å kombinere separate IC_{50} -doser av hirudin⁴⁵⁻⁶⁵ og D-Phe-Pro-Arg-Pro-OH resulterte bare i fordobling av fibrinogen-klumpningstiden, mens bidraget til spaceren var neglisjerbart. Den synergistiske virkning observert for P53 i klumpningsforsøket ble understøttet av resultater fra det fluorogene forsøk hvor denne analogen viste seg som en ren kompetitiv inhibitor i forhold til P51 med K_i -verdier nesten 50 ganger lavere enn sistnevnte. Interessant trombin-inhiberende virkning er også oppnådd med peptidene P79, P102, P103 så vel som de "avkortede" peptider P184 og P185.

Antitrombotisk aktivitet i arterie-vene shunt-modell

Eksperimentell metode.

Rotte bedøvet med uretan festes i ryggleie på en temperatur-kontrollert varmeplate. Høyre halspulsåre og venstre hals-vene kateteriseres med korte polyetylen-katetere (Portex, PE 50). Katetrene fylles med fysiologisk saltoppløsning og klemmes igjen. De to endene av katetrene fobindes med et 2 cm glass-kapillarrør (indre diameter 1,0 mm) som virker som en

trombosen overflate; 5 minutter etter intravenøs administrering av test-preparatet eller oppløsningsmidlet for dette (kontroll) åpnes klemmene som lukker for arterie-vene omkoblingen. Blodet som strømmer gjennom shunten fører til en rask stigning i temperaturen på glass-kapillarrøret fra romtemperatur til kroppstemperatur. Temperaturen i kapillarrøret tjener som en indikator for at shunten er åpen. Temperaturen måles ved hjelp av en NiCrNi-thermo-couple.

Resultater.

Den antitrombotiske virkning av P79 sammenlignet med rekombinant hirudin i arterie-vene shunt-modellen på rotter 5 minutter etter intravenøs administrering (n = antall dyr anvendt. Resultatene er vist i tabell II nedenfor.

Tabell II

Preparat	* ED15 mg/kg	(95% tillits- grense	n
P79	0,42	(0,27-1,19)	15
r-hirudin	1,42	(1,14-1,92)	32
* Dose som forårsaker forlengelse av tiden før okklusjon av shunten med 15 min.			

Stabilitet av polypeptider i plasma

Peptidene ifølge foreliggende oppfinnelse ble evaluert på in vitro plasma-stabilitet mot proteolyse. Resultatene i den medfølgende figur er et illustrativt eksempel på den komparative stabilitet av P53 og P79 (ellers betegnet som hirutonin II).

600 µg peptid ble blandet med 250 µl rekonstituert normalt humant plasma, 250 µl tromboplastin, 600 µg kalsiumklorid og 50 mM NaHPO₄ buffer pH 7,8 til et endelig volum på 900 µl.

Blandingen ble inkubert ved 37°C og 100 µl alikvoter ble tatt ut etter gitte tidsintervaller. 20 µl 10% trikloreddiksyre ble satt til hver individuelle alikvot og sentrifugert

ved 12 X K i 10 minutter. Den overliggende væsken ble injisert på en C₁₈ analytisk kolonne og kromatografert ved standard eluerings-metode (dvs. med 60% 0,1% TFA/H₂O til 0,1 TFA i CH₃CN).

De komparative resultater vist i Figur 3 illustrerer at mens P53 er mer enn 50% nedbrutt etter 30 minutter, oppviste P79 (hirutonin II) minimal eller ingen proteolyse.

Farmasøytiske preparater

Peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse kan oppnås i form av terapeutisk godtagbare salter. Eftersom peptidene har rester som fungerer både som syrer og/eller baser, kan salter av organiske syrer (f.eks. eddiksyre, melkesyre, ravsyre eller eplesyre) eller baser (f.eks. natrium, kalium eller kalsium) avledes. Disse saltene av peptidene med formel I er fullt biologisk aktive. Terapeutisk godtagbare salter kan omdannes fra et salt for å danne et annet ved å anvende egnet ionebytterharpiks på den måten som er beskrevet av R. A. Boissonas et al., Helv. Chim. Acta. 43, 1849 (1960).

Peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse, eller deres terapeutisk godtagbare salter, anvendes alene eller i kombinasjoner for behandling eller profylakse av vaskulære sykdommer som skyldes tromboser. De administreres systemisk til varmblodige dyr, f.eks. mennesker, hester eller hunder, med farmasøytisk godtagbare bærere i mengdeforhold som avhenger av oppløselighet og den valgte administreringsvei. Peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse administreres enten intravenøst, subkutan eller ved intramuskulær injeksjon sammen med farmasøytisk godtagbare bærere. Eksempler på egnede bærere finnes i standard farmasøytisk litteratur, f.eks. "Remington's Pharmaceutical Sciences", 16. ed., Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1980.

Dosen av peptidene vil variere avhengig av administreringsformen og den spesielle forbindelse. Ved injeksjon er den terapeutisk effektive dose av peptidet i et doseområde på ca. 0,05 mg/kg til 10 mg/kg kroppsvekt. I tillegg til den

aktive bestanddel, kan preparatene vanligvis også inneholde egnede buffere, f.eks. fosfat-buffer, for å opprettholde en passende pH, og natriumklorid, glukose eller mannitol for å gjøre oppløsningen isotonisk.

Peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres alene eller i kombinasjon med andre farmasøytiske midler. Peptidene kan f.eks. administreres i kombinasjon med vev-plasminogen-aktivator for å hindre reokklusjon av koronar-arteriene. Alternativt kan peptidene administreres med heparin eller lavmolekylvekt-heparin, en kombinasjon som fordelaktig kan redusere dosen av heparin eller lavmolekylvekt-heparin.

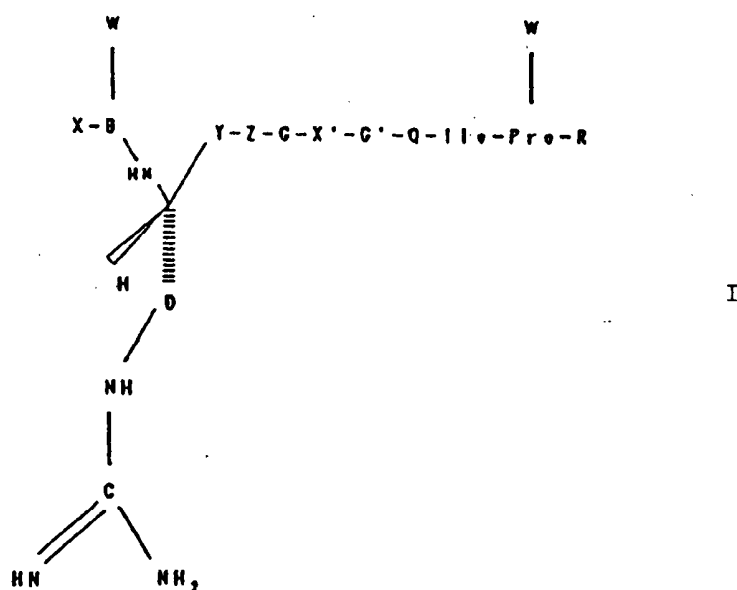
Tabell I Hemmende dissosiasjons-konstanter for bovin α -trombin-medierte hydrolyse av Tosyl-Gly-Pro-Arg-AMC med hirudin-peptider

	Analog ^c	Bovin	Human
		K _i nM ^b	K _i nM ^b
	r-Hirudin HV2		0.00038 ± 0.00005
P24	hirudin ⁵⁵⁻⁶⁵	ni ^a	ni ^a
P51	hirudin ⁴⁵⁻⁶⁵	720 ± 130	110 ± 3
P53	[D-Phe ⁴⁵ , Arg ⁴⁷]hirudin ⁴⁵⁻⁶⁵	31 ± 6	2.3 ± 0.9
P75	[D-Phe ⁴⁵ , Ala ⁴⁷]hirudin ⁴⁵⁻⁶⁵	ni ^a	41 ± 15
P52	[D-Phe ⁴⁵ , Arg ⁴⁷ , D-Pro ⁴⁸]hirudin ⁴⁵⁻⁶⁵	470 ± 180	46 ± 3
P54	[Thr ⁴⁵ , Arg ⁴⁷ , D-Pro ⁴⁸]hirudin ⁴⁵⁻⁶⁵	320 ± 100	72 ± 32
P109	[D-Phe ⁴⁵ , Arg ⁴⁷ ψ (COCH ₂) CO ⁴⁷]hirudin ⁴⁵⁻⁶⁵	---	ND ^d
P79	[D-Phe ⁴⁵ , Arg ⁴⁷ ψ (COCH ₂) CH ₂ CO ⁴⁷]hirudin ⁴⁵⁻⁶⁵	---	0.33 ± 0.05
P102	[D-Phe ⁴⁵ , Arg ⁴⁷ ψ (COCH ₂) CH ₂ CH ₂ CO ⁴⁷]hirudin ⁴⁵⁻⁶⁵	---	0.56 ± 0.14
P103	[L-Phe ⁴⁵ , Arg ⁴⁷ ψ (COCH ₂) CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ⁴⁷]hirudin ⁴⁵⁻⁶⁵	---	0.14 ± 0.02
P183	[D-Phe ⁴⁵ , Arg ⁴⁷ ψ (COCH ₂) (CH ₂) ₃ CO ⁴⁷ -(NHCH ₂ CH=CHCH ₂ CO) ₁ , Pro ⁵⁸ , Leu ⁶¹]hirudin ⁴⁵⁻⁶¹	---	300
P184	[D-Phe ⁴⁵ , Arg ⁴⁷ ψ (COCH ₂) (CH ₂) ₃ CO ⁴⁷ -(NHCH ₂ CH=CHCH ₂ CO) ₂ , Pro ⁵⁸ , Leu ⁶¹]hirudin ⁴⁵⁻⁶¹	---	3.5 ± 1.3
P185	[D-Phe ⁴⁵ , Arg ⁴⁷ ψ (COCH ₂) (CH ₂) ₃ CO ⁴⁷ -(NHCH ₂ CH=CHCH ₂ CO) ₃ , Pro ⁵⁸ , Leu ⁶¹]hirudin ⁴⁵⁻⁶¹	---	3.2 ± 1.1

^ani, ikke inhibert, ^bgjennomsnitt for tre bestemmelse ± SEM, ^calle peptider hadde korrekt aminosyre-analyse og viste korrekte pseudomolekylære ioner, ^dIkke bestemt

Patentkrav

1. Analogfremgangsmåte for fremstilling av en terapeutisk aktiv forbindelse med formel I



hvor

X er en hydrofob gruppe;

B er en rest av en hydrofob aminosyre;

D er en lineær karbonkjede med 2 til 4 karbonatomer som kan være substituert med lavere alkyl, eller D er en p-fenylmetyl- eller en p-fenyletyl-gruppe;

Y er karbonyl;

Z er en toverdig lineær koblings-gruppe med en kjedelengde på minst 10 atomer, hvor atomet i nabostilling til karbonatomet i Y kan være usubstituert eller mono- eller di-fluor-substituert, og Z kan være sammensatt av en karbonkjede som er avbrutt av én eller flere O-, S-, NH-, karbonyl-, ester- eller amidgrupper, idet det terminale atom i kjeden er et karbonatom som er en del av karbonylgruppen som danner en peptid-binding med L- α -aminosyren G;

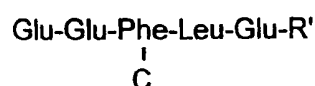
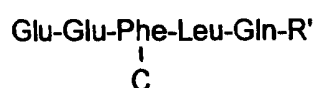
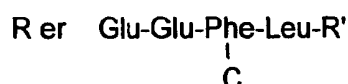
G og G' er like eller forskjellige og er en L- α -aminosyre med en pk-verdi på 5 eller lavere;

X' er en hydrofob L- α -aminosyre;

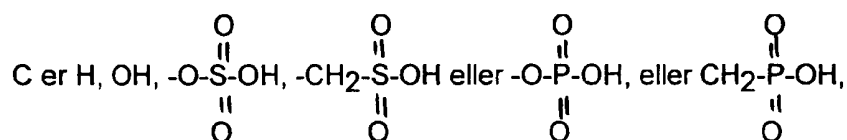
Q er en rest av en L- α -aminosyre eller en cyklisk L-iminosyre;

W er H, eller et forgrenet eller rettkjedet alkyl-, fenyl- eller fenylalkyl-radikal;

R er en hydrofob gruppe omfattende 1 til 5 aminosyrer eller et alkyl-, feny- eller fenylyl-radikal som kan være substituert med en karboksyl- eller amid-funksjon, eller

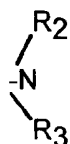


hvor

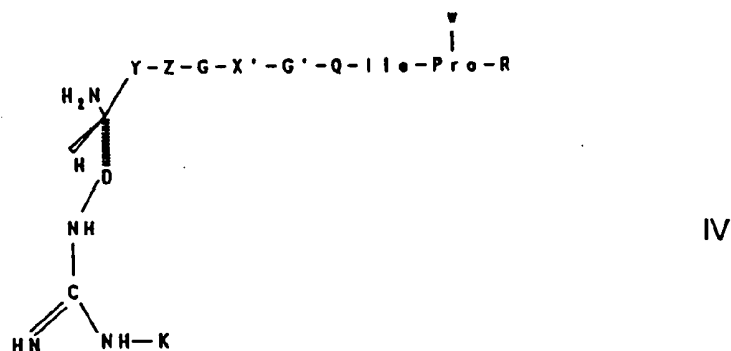


substituert i para-stillingen i fenytringen, eller

R og R' er like eller forskjellige og er en aminosyre eller en amin-gruppe med følgende formel:



hvor R₂ og R₃ er hver uavhengig hydrogen, lavere alkyl eller feny, eller kan være bundet sammen for å danne en ring med 5-6 ledd, hvilken ring eventuelt kan inneholde et ytterligere heteroatom valgt fra O, S og NH og et farmasøytisk godtagbart salt derav, eller R' er en hydroksylgruppe bundet til Leu for å danne en karboksylgruppe, eller et terapeutisk godtagbart salt derav, karakterisert ved at en forbindelse med den følgende formel IV:



hvor K er en egnet beskyttende gruppe og hvor de øvrige substituenten er som definert ovenfor, og aminosyrene på forbindelsen med formel IV er beskyttet med egnede beskyttelsesgrupper, omsettes med en forbindelse med den følgende formel V:



hvor X, B og W er som tidligere angitt, og når X er en hydrofob aminosyre, er X beskyttet med en egnet beskyttelsesgruppe;

- beskyttelsesgruppe(r) fjernes fra den resulterende forbindelse; og
- forbindelsen med formel I utvinnes.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, for fremstilling av en forbindelse med formel I hvor:

X er en hydrofob α -aminosyre i D-konfigurasjon bundet ved en peptid-binding til substituenten B, eller en hydrofob gruppe bundet til nitrogenatomet i substituenten B; B er en rest av en hydrofob α -aminosyre i L-konfigurasjon eller en cyklisk iminosyre, som kan bære én eller flere alkyl-substituenten bundet til ringen, hvilke substituenten kan danne en bro for å danne en cyklisk struktur;

W er H eller en lavere alkyl-, fenyl- eller fenylalkyl-substituent i 3-, 4- eller 5-stillingen

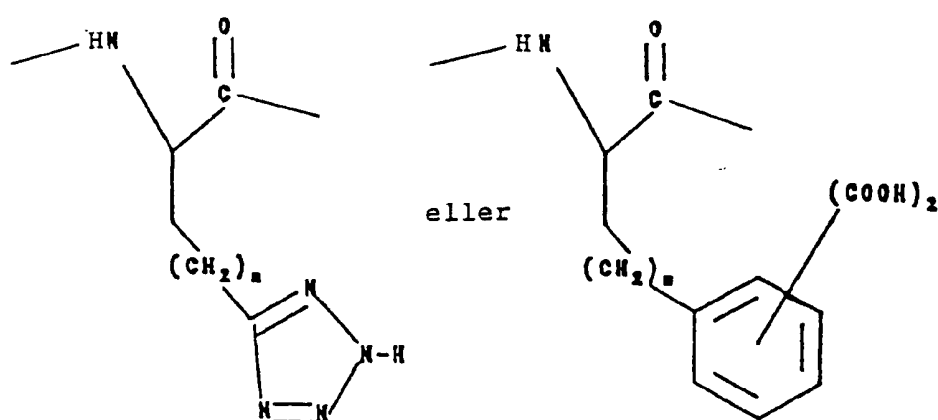
i piperidin- eller pyrrolidin-ringen;

D er p-fenylmetyl, p-fenyletyl, etylen, butylen eller propylen;

Y er karbonyl;

Z har en kjedelengde mellom 12 og 40 og fortrinnsvis 20 atomer;

G og G' er like eller forskjellige og er Asp, Glu,



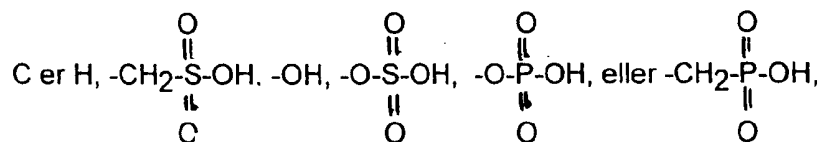
hvor n er 1 eller 2,

X' er L-Phe, L-4FPhe eller L-4ClPhe;

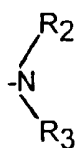
Q er prolin, pipekolinsyre, sarcosin eller Glu;

R er Glu-Glu-Phe-Leu-R' eller Leu-R', hvor

C



substituert i para-stilling i fenylingen og R' er en hydroksylgruppe eller



hvor R₂ og R₃ er lineær eller forgrenet alkyl med 1 til 6 karbonatomer eller kan være bundet sammen for å danne en ring med 5-6 ledd, og W er som definert ovenfor,

karakterisert ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, for fremstilling av en forbindelse med formel I

hvor:

X er D-Phe, D-4FPhe eller D-4ClPhe hvor α -amino-gruppen er nøytralisert ved acetylering eller benzoyletering, eller X er naftalensulfonyl, benzensulfonyl, toluensulfonyl;

B er Val, pipekolinsyre eller Pro;

W er hydrogen eller en lavere alkyl-, feny- eller fenyalkyl-substituent i 3-, 4- eller 5-stilling;

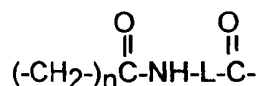
D er propylen når B er Pro eller pipekolinsyre eller fenylmetyl;

Y er karbonyl;

Z er $-(CH_2)_n\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}$ -Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-

hvor

n er et helt tall fra 1 til 4, den native hirudin⁴⁸⁻⁵⁴ sekvens eller en syntetisk spanner med den generelle formel

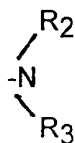


hvor

n er et helt tall fra 1 til 4; og

L er et heksapeptid eller en mettet eller umettet alkylkjede svarende til 18 atomer eller mindre av et heksapeptid;

R er Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH, Leu-OH eller Glu-Glu-Tyr-Leu-R' hvor R' er en hydroksylgruppe eller en gruppe med den følgende formel:



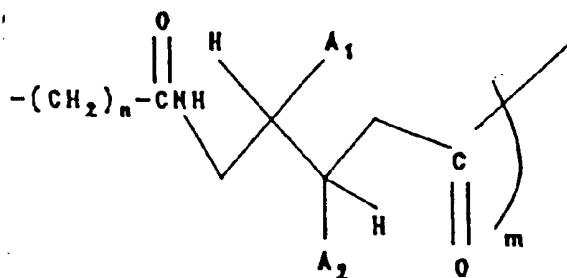
hvor

R₂ er -CH₃ eller fenetyl,

R_3 er H eller $-\text{CH}_3$ eller R_2 og R_3 kan være bundet sammen for å danne $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ eller $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, og W er som definert ovenfor,

karakterisert ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, for fremstilling av en forbindelse med formel I, hvor Z har den følgende formel:



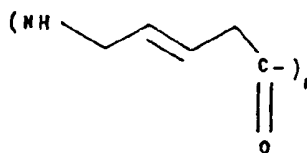
hvor

n og m er hele tall fra 1 til 4; og

A_1 , A_2 er hver uavhengig H eller des H i cis- eller trans-konfigurasjon;

med det forbehold at når m er 1, er n 3 eller 4;

hvis A_1 , A_2 er des H, da er Z



hvor p er et helt tall fra 1 til 4,

karakterisert ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 1, for fremstilling av en forbindelse med formel V

hvor

X er D-Phe;

B er prolin;

D er propylen;

Y er karbonyl;

G er Asp;

G' er Glu;

X' er Phe;

Q er Glu eller Pro;

Z er $-(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{Gln-Ser-His-Asp-Asp-Gly-}$,

$-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{Gln-Ser-His-Asp-Asp-Gly-}$,

$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{Gln-Ser-His-Asp-Asp-Gly-}$,

$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C})$,

$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C})_2$, eller

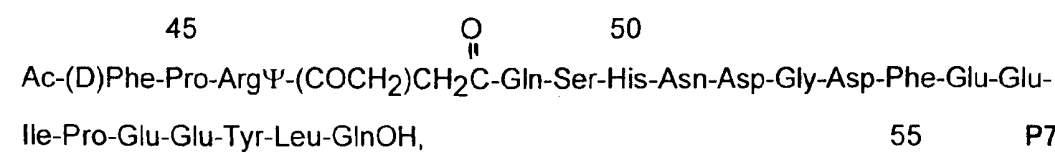
$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-(\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C})_3$;

W er H, n-butyl eller metyl; og

R' er Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH; eller -Leu-OH,

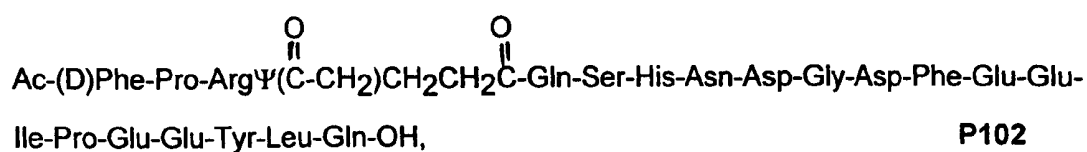
karakteriseret ved at det anvendes tilsvarende udgangsmaterialer.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1 for fremstilling af en forbindelse med den følgende formel:



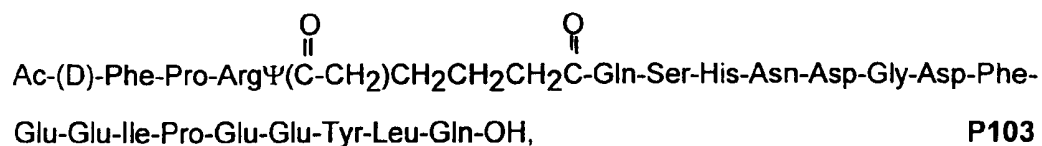
karakterisert ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av en forbindelse med den følgende formel:



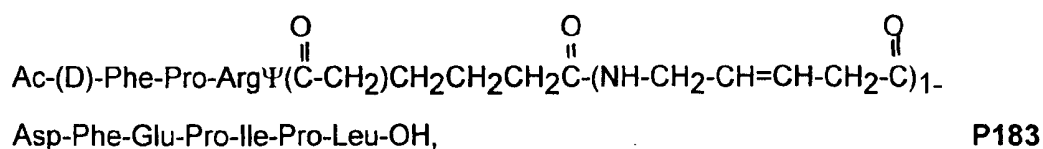
karakterisert ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av en forbindelse med den følgende formel:



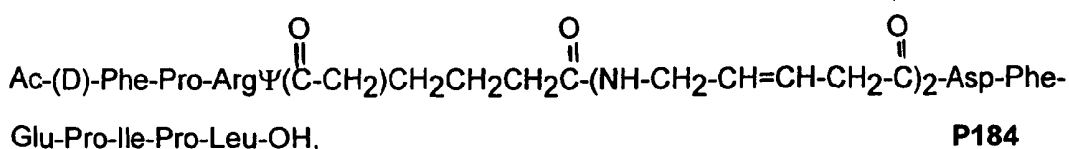
karakterisert ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer

9. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av en forbindelse med den følgende formel



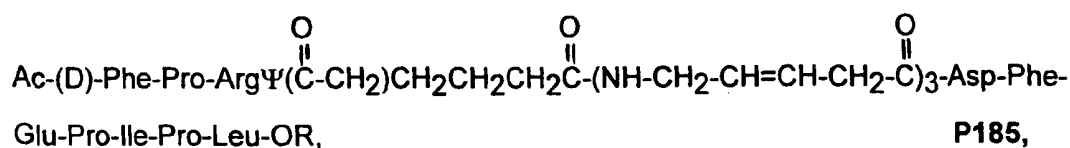
karakterisert ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer

10. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av en forbindelse med den følgende formel



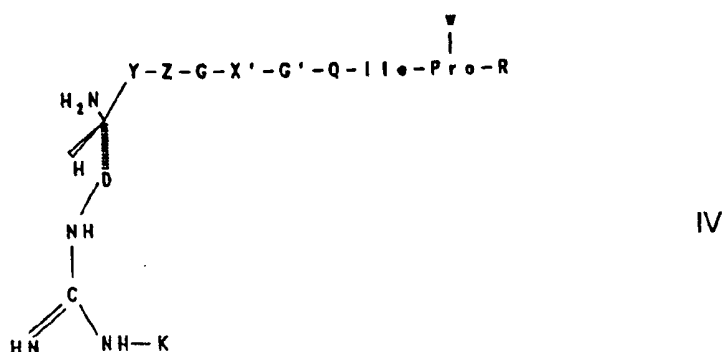
karakteriseret ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer

11. Fremgangsmåte ifølge krav 1 for fremstilling av en forbindelse med den følgende formel:



karakteriseret ved at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer

12. Ny forbindelse karakteriseret ved den følgende formel IV



hvor

D er en lineær karbonkjede med 2 til 4 karbonatomer som kan være substituert med lavere alkyl, eller D er en p-fenylmetyl- eller en p-fenyletyl-gruppe;

Y er karbonyl;

- 30 Z er en toverdig lineær koblings-gruppe med en kjedelengde på minst 10 atomer, hvor atomet i nabostilling til karbonatomet i Y kan være usubstituert eller mono- eller di-fluor-substituert, og Z kan være sammensatt av en karbonkjede som er avbrutt av

én eller flere O-, S-, NH-, karbonyl-, ester- eller amidgrupper, idet det terminale atom i kjeden er et karbonatom som er en del av karbonylgruppen som danner en peptid-binding med L- α -aminosyren G;

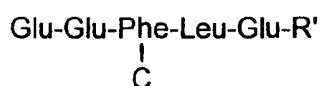
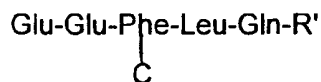
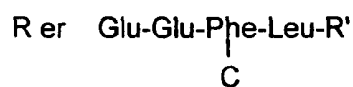
G og G' er like eller forskjellige og er en L- α -aminosyre med en pk-verdi på 5 eller lavere;

X' er en hydrofob L- α -aminosyre;

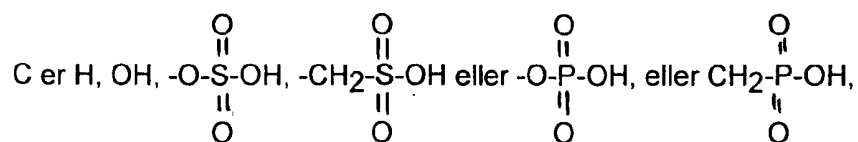
Q er en rest av en L- α -aminosyre eller en cyklisk L-iminosyre;

W er H, eller et forgrenet eller rettkjedet alkyl-, feny- eller fenylalkyl-radikal;

R er en hydrofob gruppe omfattende 1 til 5 aminosyrer eller et alkyl-, feny- eller fenylalkyl-radikal som kan være substituert med en karboksyl- eller amid-funksjon, eller

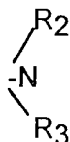


hvor



substituert i para-stillingen i fenytringen, eller

R og R' er like eller forskjellige og er en aminosyre eller en amin-gruppe med følgende formel:



hvor R_2 og R_3 er hver uavhengig hydrogen, lavere alkyl eller fenyl eller kan være bundet sammen for å danne en ring med 5-6 ledd, hvilken ring eventuelt kan inneholde et ytterligere heteroatom valgt fra O, S og NH og et farmasøytisk godtagbart salt derav, eller R' er en hydroksylgruppe bundet til Leu for å danne en karboksylgruppe, og K er en egnet beskyttelsesgruppe, og aminosyrene i nevnte forbindelse med formel IV er beskyttet med egnede beskyttelsesgrupper.

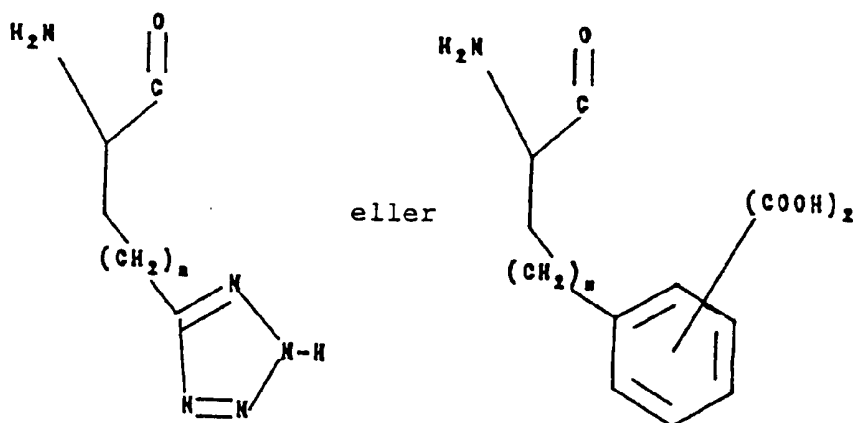
13. Forbindelse ifølge krav 12,

karakterisert ved at D er p-fenylmetyl, p-fenyletyl, etylen, butylen eller propylen;

Y er karbonyl;

Z har en kjedelengde mellom 12 og 40 og fortrinnsvis 20 atomer;

G og G' er like eller forskjellige og er Asp, Glu,



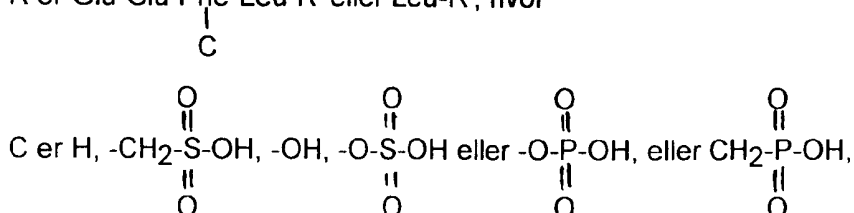
hvor n er 1 eller 2,

X' er L-Phe, L-4FPhe eller L-4CIPhe;

Q er prolin, pipekolinsyre, sarcosin eller Glu;

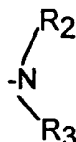
W er H eller en lavere alkyl-, fenyl- eller fenylalkyl-substituent i 3-, 4- eller 5-stillingen i piperidin- eller pyrrolidin-ringen;

R er Glu-Glu-Phe-Leu- R' eller Leu- R' , hvor



substitueret i para-stilling

og R' er en hydroksylgruppe eller



hvor R₂ og R₃ er lineær eller forgrenet alkyl med 1 til 6 karbonatomer og kan være bundet sammen for at danne en ring med 5-6 ledd.

14. Forbindelse ifølge krav 12,

karakteriseret ved at

W er hydrogen eller en lavere alkyl-, feny- eller fenyalkyl-substituent i 3-, 4- eller 5-stilling;

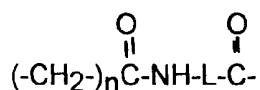
D er propylen i ringen når B er Pro eller pipekolinsyre eller fenylmetyl;

Y er karbonyl;

Z er $-(\text{CH}_2)_n\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly}-$

hvor

n er et helt tal fra 1 til 4, den native hirudin⁴⁸⁻⁵⁴ sekvens eller en syntetisk spanner med den generelle formel

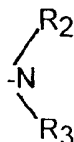


hvor

n er et helt tal fra 1 til 4; og

L er et heksapeptid eller en mettet eller umettet alkylkæde svarende til 18 atomer eller mindre af et heksapeptid;

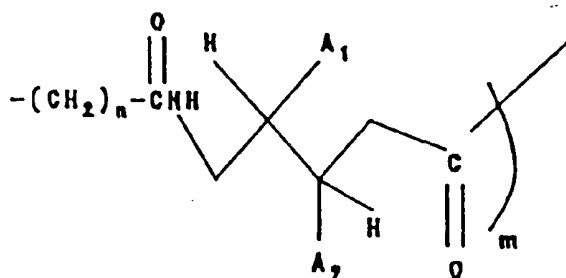
R er Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH, Leu-OH eller Glu-Glu-Tyr-Leu-R' hvor R' er en hydroksylgruppe eller en gruppe med den følgende formel:



R_2 er $-\text{CH}_3$ eller fenetyl,

R_3 er H eller $-\text{CH}_3$ eller R_2 og R_3 kan være bundet sammen for å danne $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ eller $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.

15. Forbindelse ifølge krav 14,
karakterisert ved at
Z har den følgende formel:



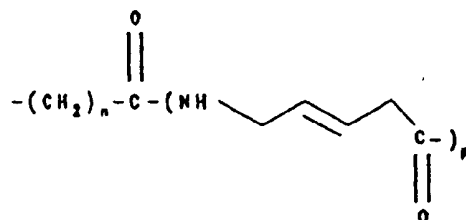
hvor

n og m er hele tall fra 1 til 4; og

A_1 , A_2 er hver uavhengig H eller des H i cis- eller trans-konfigurasjon;

med det forbehold at når m er 1, er n 3 eller 4;

hvis A_1 , A_2 er des H, da er Z



hvor p er et helt tall fra 1 til 4.

16. Forbindelse ifølge krav 12,
karakterisert ved at

D er propylen;

Y er karbonyl;

G er Asp;

G' er Glu;

X' er Phe;

Q er Glu eller Pro;

Z er $-(\text{CH}_2)_2-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{Gln-Ser-His-Asp-Asp-Gly-}$,

$-(\text{CH}_2)_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{Gln-Ser-His-Asp-Asp-Gly-}$,

$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{Gln-Ser-His-Asp-Asp-Gly-}$,

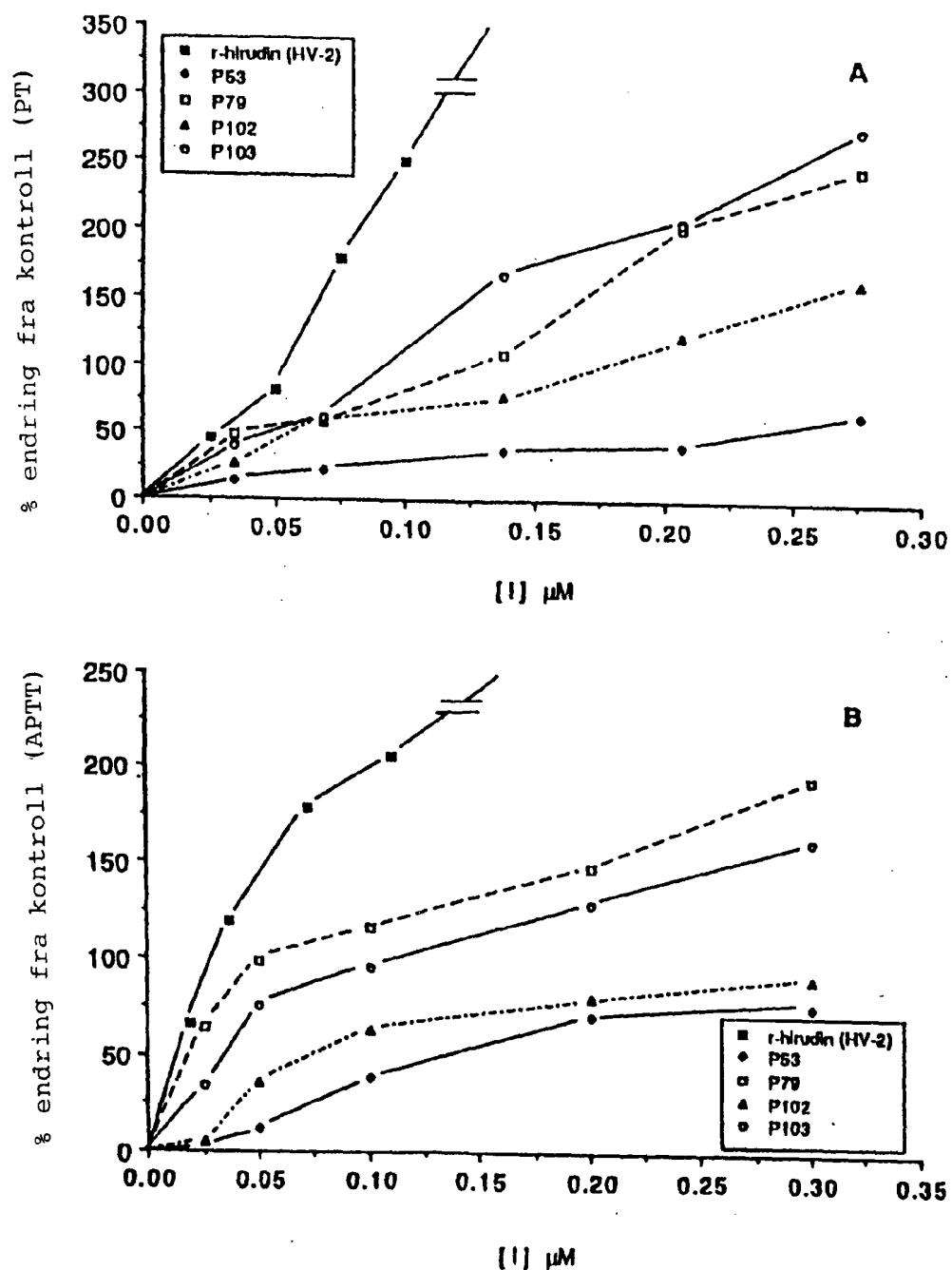
$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-(\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}})$,

$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-(\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}})_2$, eller

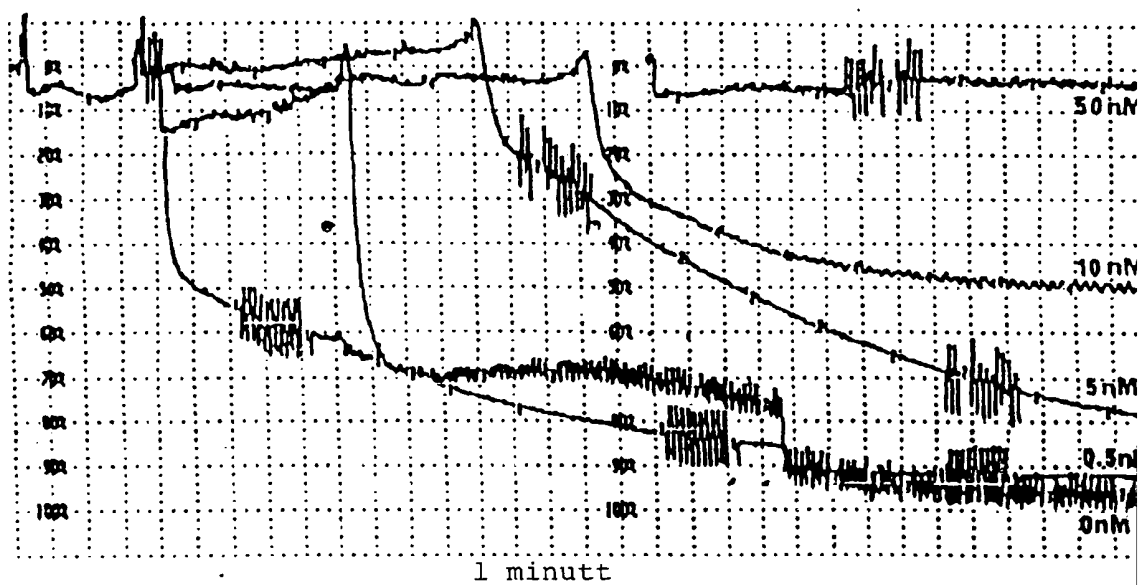
$-(\text{CH}_2)_4-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-(\text{NHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}})_3$;

W er H, n-butyl eller metyl; og

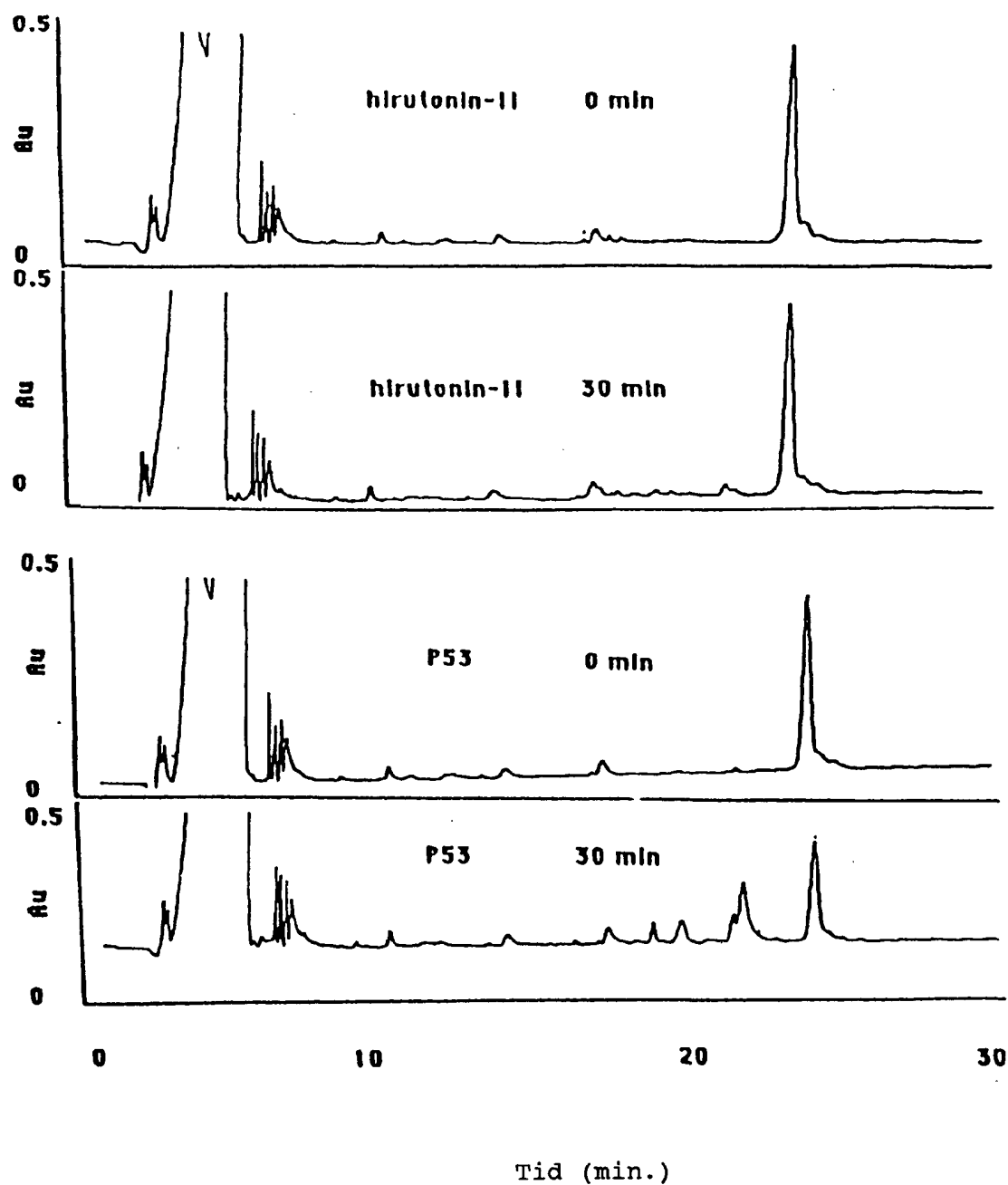
R' er Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH; eller -Leu-OH.



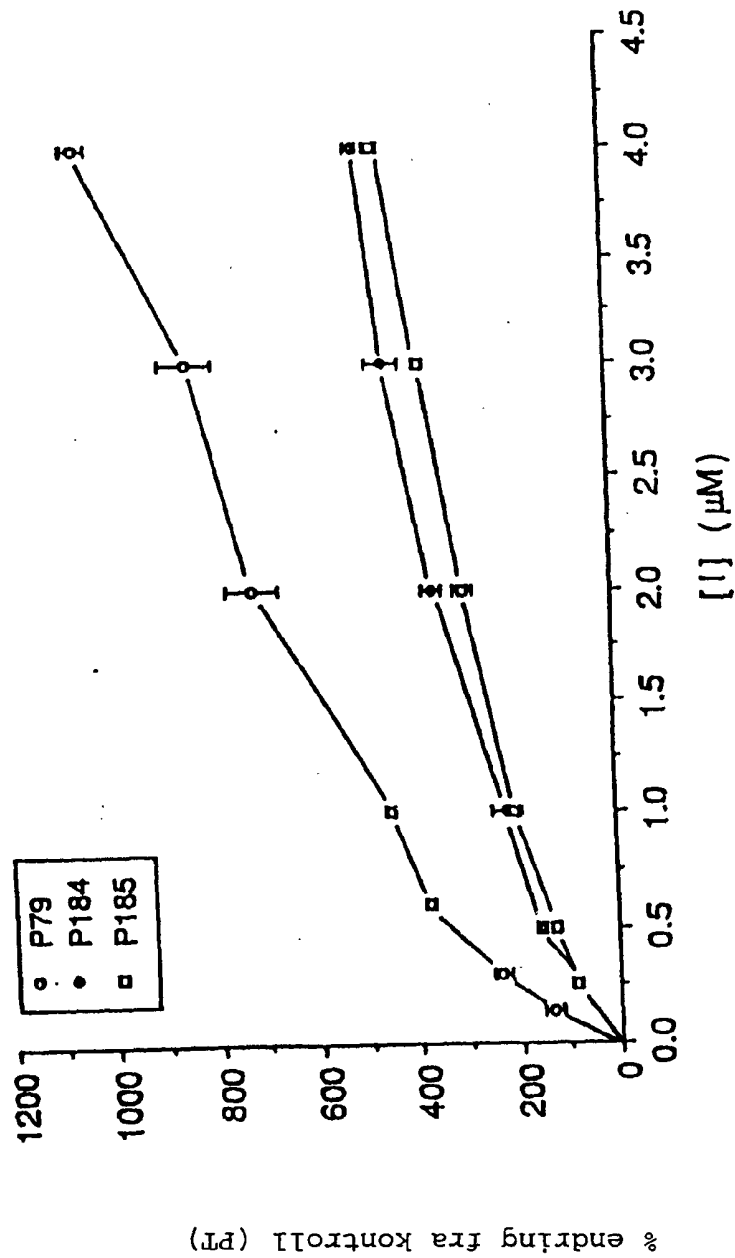
Figur 1: Protrombin-tid (A) og aktivert partiell tromboplastin-tid (B) i normalt, humant plasma for peptidene P53, P79, P102, P103 or r-hirudin (HV-2)



Figur 2: Inhibering av trombin-aktivert blodplate-aggregering med P79



Figur 3: Komparativ proteolyse av hirutinin-II [P79, Ac-[(D)Phe⁴⁵.Arg^ψ(COCH₂)CH₂CO)⁴⁷]hir⁴⁵⁻⁶⁵] og P53 [Ac-[D-Phe⁴⁵,Arg⁴⁷]hir⁴⁵⁻⁶⁵] i humant plasma



Figur 4: Komparative plasma protrombin-tider for P79, P184 og P185. P183 oppviser 100% endring fra kontroll ved 50 μm.