

LV 10109

①9

LATVIJAS REPUBLIKAS  
PATENTU VALDE

①1 LV 10109 B

⑤1 Int.cl. <sup>5</sup> C07K7/06  
A61K37/02Latvijas patents uz izgudrojumu  
1993.g.2.marta Latvijas Republikas likums

①2

Īsziņas

②1 Pieteikuma numurs: P-92-686

②2 Pieteikuma datums: 30.12.1992\*

④1 Pieteikuma publikācijas datums: 10.05.1994

④5 Patenta publikācijas datums: 20.02.1995

③0 Prioritāte:  
5745/90                      03.09.1990                      HU

⑦3 Īpašnieks(i):  
RICHTER GEDEON Vegyészeti Gyár Rt.,  
Gyömrői ut., 19-21, Budapest, 1103 (HU)

⑦2 Izgudrotājs(i):  
Dr.András BALÁZS (HU),  
Dr.István SCHÖN (HU),  
Tamás SZIRTES (HU),  
Dr.Lajos KISFALUDY (HU),

⑦4 Pilnvarotais vai pārstāvis:  
Vladimirs ANOHINS, Aģentūra  
"TRIA ROBIT", Aizkraukles iela 23-245,  
Rīga, LV-1006

⑤4 Virsraksts: **Jauni oligopeptīdi, kuri selektīvi inhibē asinis radošu šūnu proliferāciju, farmaceutiskais sastāvs uz to bāzes un jaunu oligopeptīdu un sastāvu iegūšanas metode**

⑤7 Kopsavilkums: Izgudrojums attiecināms uz sekojošiem asinsrades šūnu proliferāciju selektīvi inhibējošiem peptīdiem, atbilstoši formulām: Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH, kurās ar Acm apzīmēta acetamīdometilgrupa, to sāļiem, zāļu farmaceutiskiem sastāviem uz to bāzes, kā arī uz jaunu peptīdu un zāļu farmaceutisko sastāvu iegūšanas metodēm. Izgudrojums aptver arī zīdītājdzīvnieku (ieskaitot cilvēkus) ārstēšanu ar šiem pašiem peptīdiem un zāļu formām uz to bāzes, lai selektīvi inhibētu hemopoēzes šūnu proliferāciju. Jauno savienojumu priekšrocība ir tā, ka tie gandrīz pilnīgi nekaitīgi, tiem nav nekādu blakusefektu terapeitisko devu iedarbības diapazonā. Papildus tam, šie savienojumi ievērojami inhibē ārstniecisko līdzekļu un starojuma, ko parasti lieto audzēju terapijā, kaitīgo iedarbību. Kad ievada šos savienojumus, var tikt palielināta ārstnieciskā līdzekļa doza vai starojuma doza.

**ASINSRADES ŠĪNU PROLIFERĀCIJU INHIBĒJOŠI JAUNI  
OLIGOPEPTĪDI, ZĀĻU FARMACEITISKIE SASTĀVI UN TO BĀZES UN  
JAUNU OLIGOPEPTĪDU UN ZĀĻU FARMACEITISKO SASTĀVU  
IEGŪŠANAS METODES**

Tehnikas nozare

Izgudrojums attiecināms uz sekojošiem peptīdiem, atbilstoši formulām:

(1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un

(2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH

kurās ar Acm apzīmēta acetamīdometilgrupa, to sāļiem, zāļu farmaceutiskiem sastāviem un to bāzes, kā arī uz jaunu peptīdu un zāļu farmaceutisko sastāvu iegūšanas metodēm.

Jaunie peptīdi selektīvi inhibē asinsrades šūnu proliferāciju.

Izgudrojums aptver arī zīdītājdzīvnieku (ieskaitot cilvēkus) apstrādi ar šiem peptīdiem un zāļu formām un to bāzes, lai selektīvi inhibētu asinsrades šūnu proliferāciju.

Situācijas raksturojums nozarē

Abi oligopeptīdi ir hemoregulējoša pentapeptīda analogi, ko var izdalīt no dabas izejvielām. Zemmolekulāro bioloģiski aktīvo vielu izdalīšanu no pieaugušiem granulocītiem un no žurku smadzeņu (kaula smadzeņu) vielas suspensijas pirmo reizi aprakstījuši autori Rytömaa un Kiviniemi. Šīs bioloģiski aktīvās vielas inhibēja žurku mielopoēzes šūnu proliferāciju mēģinājumos in vitro [Cell Tissue Kinet., 1, 329 un 341 (1968)].

Granulocita keilons, kā to nosauca sākumā, aizkavēja šūnu cikla proliferāciju S-fāzē un inhibēja to S<sub>1</sub>-fāzē [Virchovs Arch.Abt.B.Zellpatl., 14, 293 (1973)], tajā pašā laikā inhibēšana notiek šūnu cikla G<sub>1</sub>-fāzē [In vitro, 1.,47 (1969)].

Pirmā homogēni attīrīta mielopoēzi inhibējoša aktīvā viela aprakstīta žurnālā Cell Biol.Interact.Rep.,1.,337 (1980). Šī bioloģiski aktīvā viela pēc ķīmiskās uzbūves pieskaitāma nukleo-peptīdiem. Izdalīšana, aptuvena struktūranalīze un sintēze pirmoreiz aprakstīti žurnālā Z.Naturforsch.,37c, 1297 (1982).

1986.gadā ir paziņots, ka sintētiskajam pentapeptīdam Glp-Glu-Asp-Cys-Lys-OH ir tāda pati bioloģiskā iedarbība kā vielai, kas iegūta no dabīgajām vielām [Biological Regulation of Cell Proliferation, edited by Basega, Foa, Netcalf and Polli, Raven Press, New York, 1986, page 11].

Līdz šim hemoregulējošais peptīds ir izdalīts no cilvēka granulocītiem, žurku smadzeņu vielas un teļa liesas. Mielopoēzes inhibēšanas efekts uz peļu, žurku un cilvēka šūnām ir atkarīgs no devas, kuras koncentrācija ir lielāka par 10<sup>-13</sup> moli/litrā. Blakusefekta nav. Peptīds nav toksisks peļu un cilvēka kaula smadzeņu šūnām koncentrācijā no 10<sup>-15</sup> līdz 10<sup>-4</sup> moli/litrā 7 dienu apstrādes laikā in vitro, kā arī attiecībā uz divu tipu pelēm ar devu 9.1 mg/dzīvnieks vai 1 mg/dzīvnieks [Pharmac.Ther.,44, 353 (1989)].

Tāpēc ir likumsakarīgi, ka hemoregulējošais peptīds ir jāuzskata kā nākošais ārstnieciskais līdzeklis, kas aizsargā kaula smadzenes no bojājumiem, kurus izsauc citostatiskie aģenti un apstarojums, kurus lieto pie audzēju ārstēšanas. Arī citās farmācijas nozarēs šī peptīda lietošana ir daudzsolša.

Neviens no nedaudzajiem līdz šim sintezētiem analogiem nav uzrādījis līdzīgu bioloģisku aktivitāti. Daži dati norāda, ka grūtības, nosakot pentapeptīda uzbūvi, kurš sastāv tikai no trim funkcionālām aminoskābēm un aminopiroglutārskābes, ir saistītas ar noārdīšanās procesiem sintēzes gaitā.

Žurnālā Cancer Res., 50., 328 (1990) autori vērš uzmanību uz merkaptogrupu saturošā savienojumā oksidēšanās dēļ notiekošo

3.

dimerizāciju un uz savienojuma inaktivāciju ūdens šķīdumā pie atkārtotas sasalšanas/atkausēšanas. Spēja dimerizēties ir sevišķi bīstama, tā ka dimēra fizioloģiskā aktivitāte ir pretēja monomēra aktivitātei [Exp.Hematol., 12, 7 (1984); Exp.Hematol., 16, 274 (1988)].

5           Apakstā nav paskaidrojumu attiecībā uz aktivitātes trūkumu dažiem sintētiskiem paraugiem un uz inaktivāciju. Pēc mūsu domām, to varētu daļēji izskaidrot ar savienojumu, kas satur asparagīnskābi, ciklizāciju, izomerizāciju un epimerizāciju [J.Chrm.Soc. Chem.Comm., 1983, 505; Acta Chim. Hung., 124, 919 (1987); Peptides 1986, editor: Theodoropoulos, de Cruyter, Berlin, 1987, 83; Coll. Chech. Chem. Commun. 54, 3360 (1989)].

10           Pretējais, tas ir, proliferāciju stimulējošais efekts dimēra molekulai (Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH)<sub>2</sub> un Glp-Glu-Asp-Met-Lys-OH vājā iedarbība uz proliferāciju norāda, ka cisteīna merkaptogrūpai ir svarīga nozīme bioloģiskās aktivitātes izpausmē. Uz merkaptogrūpas klātbūtnes nepieciešamību norāda tas fakts, ka no dabas vielām izolētais pentapeptīds Glp-Glu-Asp-Cys-Lys-OH var inhibēt proliferāciju tikai merkaptoetanolā vidē (no 0.1 līdz 0.3

20           moli/litrā), bet bez merkaptoetanolā klātbūtnes tas nav efektīvs.

          Starp citu, pārsteidzoši ir tas, ka gan Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH (saturošs acetamīdogrūpu) gan H-Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH (ar atšķeltu gala aminogrūpu) uzrāda ievērojamu un selektīvu inhibējošu efektu uz žurku muguras un kaula smadzeņu šūnu proliferāciju.

25           

          Ietekmi uz šūnu proliferāciju var mērīt ar dažādiem paņēmieniem. Šajos mēģinājumos, piemēram, var noteikt timidīnā tritiju saturošas DNS ieslēgšanu pie īslaicīgas šūnu kultivēšanas (žurku aizkrūts dziedera un kaula smadzeņu šūnas), vai arī noteikt iespēju veidoties peļu kaula smadzeņu šūnu rindām pusšķidra agara kultūrās.

30           

#### Izgudrojuma sīks apraksts

Izgudrojumam atbilstošos savienojumus pārbauda sekojoši:

#### Pārbaude ar īslaicīgu kultivēšanu

35           Žurku kaulu smadzeņu šūnas, lietojamas īslaicīgai audzēšanai, ņem no divu nedēļu vecām 40 g smagām žurkām. Dzīvniekiem pēc

dekapitācijas ņem smadzeņu vielu no stīlba kaula, ko suspendē Parker "TC-199" (produkts OKI) barotnē kopā ar 10% teļa augļa asins sērumu (produkts Gibco).

- 5 No suspensijas ņemtos paraugus, kuri satur  $3 \times 10^6$  smadzeņu vielas citoblasta šūnu mililitrā, inkubē tīrā veidā (kontrolmēģinājumi) pētāmo vielu klātbūtnē pie  $37^\circ\text{C}$  piesātinātu tvaiku 5% pēc tilpuma  $\text{CO}_2$  gāzes atmosfērā. Inkubācija notiek 4 stundas asinsanalīzēm paredzētās mēģenēs *B 5060 EK firmas Heraeus* inkubātorā.
- 10 Trešās inkubācijas stundas laikā pievieno 36 kBq/ml tritiju saturošu timidīnu  $^3\text{H-Tor}$  (UVWR produkts, Prāga) ar īpatnējo aktivitāti 721 mBq/ml.
- Pēc 60 minūtēm ar pipetes palīdzību paraugu pārnes  $2 \times 100$  mkl alikvotas uz 3 MM Whatman papīra filtrējošiem diskiem, mazgā ar ledū atdzesētu 5% hlorskābi, pēc tam mazgā 5 minūtes ar etanolu un 5 minūtes ar dietilēteri. Žāvē.
- 15 Papīra disku radioaktivitāti izmērija uz toluola bāzes gatavotā maisījumā, kam pievienots 5 g/l 2,5-difeniloksazola un 0.3 g/l 1,4-bis-[2-(5-fenil)-oksazolil]-benzola šķidrums scintilācijas *Pacard-Tricard* tipa spektrometrā. Skaitīja impulsu skaitu minūtē.
- 20 Impulsu skaitu uz katru paraugu salīdzināja ar neapstrādāta kontrolparauga impulsu skaitu un izteica procentos attiecībā pret neapstrādāto kontrolparaugu.
- Saskaņā ar iegūtajiem rezultātiem tritiju saturoša timidīna ievadišana šūnu kultūrā samazinājās par 3 %, ņemot  $10^7$  moli/litrā Glp-Glu-Asp-Cys-Lys-OH, bet tritiju saturoša timidīna ievadišana šūnu kultūrā samazinājās par 22 % ņemot  $10^7$  moli/litrā Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH.
- 25 Pārbaude uz ilgstošu šūnu kultivēšanu.
- 30 Pie ilgstošas no peļu kaula smadzenēm izdalītu šūnu kultivēšanas lietoja pusšķidro agara barotni.  $1.5 \times 10^5$  gurna kaula smadzeņu vielas šūnu, kas iegūta no 2 - 3 mēnešus veciem peļu tēviņiem C5781, suspendēja 1 ml barotnes "McCoy 5A" (produkts Gibco), pēc tam pievienoja 20 tilpuma procentus zirga asins sērumu
- 35 (produkts Gibco), 16 tilpuma procentus L-šūnas KSF (kolonijas

5.

stimulējošs faktors, kas iegūts no limfocītu virsnogulšņu šķidrums; Debrecenas Medicīnas Universitātes Farmakoloģijas institūta produkts, Ungārija) un agar-agaru līdz 0.18 svara procentiem. 100 mkl pusšķidrās vides kultivēja 7 dienas mikropipetes kapilārā saskaņā ar iepriekšminēto aprakstu, pēc tam kolonijas skaitīja stereomikroskopā Zeiss-Cytoplast ar 40-kārtīgu palielinājumu.

Rezultāti doti procentos, kas norāda par cik samazinājies koloniju skaits salīdzinot ar kontroles mēģinājumu. Mēģinājumus veica merkaptoetanolā 0.25 milimoli/l klātbūtnē (+ME) un bez merkaptoetanolā (-ME).

Rezultāti apkopoti tabulā:

15	Koncentrācija	(A)	(1)	(2)
	(10 <sup>-x</sup> moli/l)	(%)	(%)	(%)
	X	(+ME)	(+ME)(-ME)	(-ME)
	4	27	39 89	-
	6	90		66
20	8	90	68 77	64
	9			26
	10	81		52
	12	32	48 70	36
	14	18		29

25 Tabulā ar (A) apzīmēts peptīds Glp-Glu-Asp-Cys-Lys-OH, ar (1) apzīmēts peptīds Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH, bet ar (2) apzīmēts peptīds H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH.

30 Šūnu kultūrām, kuras lieto eksperimentā ar timidīnu, ir īss mūžs, tāpēc DNS modifikācija tiek mērīta tikai tām šūnām, kuras ir 4 stundu ilgas inkubēšanas cikla S-fāzē (šajā laikā šūnas uzņem radioaktīvo timidīnu). Šī daļa ir 25 — 30% šūnu. Pārējās šūnas atrodas C<sub>0</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> vai M fāzē.

35 Tādējādi inhibēšanas lielumi, kas izmērīti mēģinājumā ar timidīnu, ir vājāki nekā to var sasniegt mēģinājumā uz šūnu kolonijām. Tā pēdējā mēģinājumā mērķšūnas ir kultivētas 1 nedēļu pēc ārstēšanas,

tādējādi inhibēšanas lielumi var uzkrāties un pat samazināt viens otru.

5 Tetrapeptīds  $\text{H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH}$ , kurā iztrūkst piroglutamīnskābes atlikuma pie brīvā amino-gala, uzrādīja īpatnēju iedarbību. Pamatojoties uz mērījumiem par tritij saturu, konstatēja, ka šis savienojums inhibēja par 25 — 65% kultūru veidošanos pusšķidrā agārā pie koncentrācijas  $10^{-14}$  —  $10^{-6}$  moli/litrā, bet savienojums neinhibēja proliferāciju ne žurku kaula smadzeņu ne aizkrūts dziedera šūnās.

10 Pentapeptīds ar formulu (1)  $\text{Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH}$ , kurš inhibē kā timidīna ievadīšanu, tā arī koloniju veidošanos, iedarbojas uz muguras vai kaula smadzeņu stumbra asinsrades šūnām (CFUs) un iedarbojas uz muguras vai kaula smadzeņu šūnām (CFUs), kā arī uz muguras vai kaula smadzeņu priekššūnām, mieloblastiem, 15 promielocītiem un mielocītiem.

Tetrapeptīds ar formulu (2)  $\text{H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH}$  neuzrāda nekādu efektu uz šīm šūnām, tomēr tas inhibē ar sevišķi augstu selektivitāti šūnu koloniju veidošanās proliferāciju, muguras un kaula smadzeņu stumbra šūnu (CFUs) proliferāciju, tātad tam ir 20 specifiska iedarbība kā uz šūnu līnijām tā arī uz sektoru.

Mēģinājumos ar  $^{51}\text{Cr}$  emisiju ar kaula smadzeņu citoblasta šūnām, kas attaino savienojuma toksicitāti in vitro, abi izgudrojumā minētie peptīdi izrādījās netoksiski.

25 Nolūkā mērit aktivitāti in vivo, savienojumus ievadīja 40 g smagām žurkām intraparenterāli. Atzīmēja 40% smadzeņu vielas mitozes samazināšanos salīdzinot ar kontrolmēģinājumu. Tādējādi proliferācijas inhibēšana in vivo var tikt uzskatīta par ievērojamu.

30 Acetamīdometilgrupas klātbūtne ir svarīga ne tikai no bioloģiskās aktivitātes viedokļa, bet arī no ķīmiskā viedokļa, jo novērš bieži novērojamo molekulas nestabilitāti, kas piemīt savienojumiem ar brīvo merkaptogrupu, kā arī novērš ievērojamu rezultātu novirzi bioloģiskos testos, ko daļēji pieraksta savienojumu nestabilitātei.

35 Cik mums ir zināms, tad šie ir pirmie bioloģiski aktīvie merkaptosavienojumi, kuri satur Acm-grupu. Šo savienojumu priekšrocība ir tā, ka tie grūti oksidējas ar gaisa skābekli, salīdzinot ar

7.

savienojumiem, kuriem ir brīvā merkaptogrūpa. Tāpēc tie ir daudz stabilāki un var tikt ilgāk uzglabāti normālos apstākļos.

5 Cita priekšrocība oligopeptīdiem saskaņā ar izgudrojumu [ar formulām (1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH] ir tā, ka to iegūšanas pamatā ir vienkārša sintēze šķīdumā vai cietā fāzē, salīdzinot ar augstmolekulāriem polipeptīdiem, kuri arī uzrāda līdzīgu aktivitāti [Nature, 344, 442 (1990)].

10 Peptīdus saskaņā ar izgudrojumu (1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH iegūst pakāpeniski pagarinot aizsargātas peptīdu (1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH starproduktu ķēdītes, izejot no C-gala aminoskābes atvasinājuma, izmantojot pakāpeniskā secībā aktīvā ēstera saistīšanu un katalītisku bāzes alfa-aminogrupas atbrīvošanu, vienlaicīgi nodrošinot nereaģējošo amino- un karboksilgrupu aizsardzību ar aizsarggrupām, kuras vēlāk var atšķelt vājas acidolīzes ceļā, un cisteīna paliekas merkaptogrūpas aizsardzību ar acetamīdometilgrupu, kuru tāpat atšķēļ ar vāju acidolīzi.

20 Ja nepieciešams, brīvie oligopeptīdi atbilstoši formulām (1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH var tikt pārvērsti ar skābju palīdzību par attiecīgiem sāļiem.

Sintēzes gaitā izmantota tāda aizsarggrupu kombinācija, kura atļauj aminoaizsarggrupas selektīvu atšķelšanu, bet visu pret skābēm 25 jutīgo aizsarggrupu atšķelšanu sintēzes beigās iespējams veikt vienā stadijā.

Peptīdu saite veidojas ar aktīva ēstera palīdzību, vislabāk ar pentafluorfenilēstera (OPfp) metodi [Synthesis, 1983, 325].

30 Alfa-aminogrupu, kuras pēc tam ir jāiebūvē peptīdu saitē, aizsardzībai starpstadijās izmanto 9-fluorofenil-metil-oksikarbonilgrupu (Fmoc), kuru var vēlāk atšķelt ar bāzēm. Oligopeptīda ar formulu (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH lizīna epsilon-aminogrupas un glutamīnskābes aminogrupas un, iespējams, oligopeptīda ar formulu (1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH 35 piroglutamīnskābes amīda slāpekļa aizsardzībai vislabāk lietot

*terc*-butoksikarbonilgrupu (Boc). Aizsargājot neaktivētās karboksilgrupas sānu virknēs vai gala karboksilgrupas, priekšrocības ir esterificēšanai ar *terc*-butilspirtu.

5 Pēc augstākpraktētām metodēm aizsargātiem peptīdiem aizsarggrupas, izņemot S-acetamidometilgrupu, atšķeļ. Pēc tam, ja tas ir nepieciešams, iegūtais oligopeptīds tiek pārveidots pār sāli, ar anjonapmaiņas sveķu palīdzību pievienojot skābi, kuras anjongrupa ir spējīga veidot sāli.

10 Tādā veidā iegūtie peptīdi ir farmaceutiski tīri, kuriem tālaka attīrīšana nav nepieciešama. Ja tomēr attīrīšana ir nepieciešama, to veic uz silikagēla kolonas vai ar šķidrums hromatografijas palīdzību.

15 Ja peptīds iegūts šķīdumā, to var izolēt ietvaicējot vai arī šķīdumu liofilizējot. Brīvo peptīdu var pārveidot par sāli, pievienojot farmaceutiski saderīgu skābi, piem., veido sālsskābes, sērskābes, fosforskābes, etiķskābes, citronskābes, maleīnskābes vai mandeļskābes sāļus.

20 Peptīdi saskaņā ar izgudrojumu un to sāļi, veidoti ar skābēm, var tikt izmantoti zāļu farmaceutiskos sastāvos kā pildvielas audzēju terapijā.

25 Jauno savienojumu priekšrocība ir tāda, ka tie nav toksiski, tiem terapeitisko devu diapazonā nav blakusiedarbības efektu un vēl tie ievērojami inhibē kaitīgo ārstniecisko līdzekļu un starojuma iedarbību, kurus lieto audzēju ārstēšanai. Šos savienojumus ievadot organismā kopā ar ārstnieciskām vielām, var tikt palielināta ārstnieciskā preparāta vai apstarošanas deva.

30 Peptīdus ar formulām (1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH var ievadīt tīrā veidā, sāļu veidā, farmaceutiski izdevīgā agregātstāvoklī — cietā, šķīdrā vai pusšķīdrā formā.

Pie zāļu sastāvu pagatavošanas var lietot parastos nesējus, atšķaidītājus, stabilizējošus, pH-regulējošus, osmotisko spiedienu regulējošus līdzekļus, ārstnieciskā līdzekļa pagatavošanas tehnoloģiju pieļaujošas vai sekmējošas piedevas un ekscipientus.

35 Cietie zāļu farmaceutiskie sastāvi var būt, piem., pulverveida

9.  
injekcijām. Šķidrie var būt injecējami uzlējumi, vai pat mikrokapsulas. Pacientam ievada zāļu farmaceitisko sastāvu ar noteiktu ārstnieciskā līdzekļa devu. Šī deva ir atkarīga no saslimšanas smaguma pakāpes, recipienta svara, ievadišanas veida, lietošanas biežuma dienā u.c. Devu nosaka ārsts.

lai vienkāršotu ievadišanu, gatavo vienreizējas lietošanas devas, kas var saturēt vienu devu, vai divkāršu devu, vai pusdevu, vai trešdaļu, ceturtdaļu no ievadāmā ārstniecības līdzekļa daudzuma.

10 Farmaceutiskie sastāvi saskaņā ar izgudrojumu parasti satur no 1 — 250 mg aktīvā ingredienta vienā vienreizējā devā. Aktīvā ingredienta augšējo un apakšējo robežu var mainīt.

Izgudrojumu sīkāk raksturo sekojoši darba piemēri, kuriem nav ierobežojošs raksturs.

15 Saīsinājumi, kurus lieto aprakstā, atbilst vispārpieņemtiem [Biochem.J. 219, 345 (1984)]. Visām aminoskābēm ir L-konfigurācija.

Aminoskābju analīžu datus ar "Tin" apzīmē 4-tiazolidīnkarbonskābi, kura veidojas acetamīdometilcisteīna hidrolīzes rezultātā.

20 Kušanas temperatūra tika noteikta *doktora Tottoli aparātā* (*firma Büchi, Šveice*).

Pētījumus ar plānā slāņa hromatogrāfijas metodēm veica uz gatavām silikagēla plātēm (*DC-Fertigplatten, Merck, Vācija*) ar sekojošiem šķīdinātāju sastāviem (tūpumu attiecībās):

"pamata šķīdums": 20 : 6 : 11 (piridīns/ etiķskābe/ ūdens)

1)	99 : 1	(etilacetāts/ pamatšķīdums)
2)	19 : 5	(etilacetāts/ pamatšķīdums)
3)	9 : 1	(etilacetāts/ pamatšķīdums)
4)	4 : 1	(etilacetāts/ pamatšķīdums)
5)	2 : 3	(etilacetāts/ pamatšķīdums)
6)	1 : 4	(etilacetāts/ pamatšķīdums)
7)	3 : 7	(etilacetāts/ pamatšķīdums)
8)	1 : 1 : 1 : 1	(n-butanols/etiķskābe/etilacetāts/ /ūdens

Hromatogrammas tika attīstītas ar ninhidrīna un pēc hlorēšanas ar KJ/tolidīna palīdzību.

- Mērījumus ar augsti efektīvo šķidrums hromatogrāfiju veica  
 5 HPLC aparatūrā, kam pierikots UV-detektors *Labor-MIM 300* tipa ar maināmu viļņu garumu, *Labor-MIM* inžektoru, eluentsūkli un manometru, kam ir firmas *Gilson bloki 8020* un *302*, un *Radelkis OH-827* tipa pašrakstūtajs.

10 Hromatografēšanu veic 150 cm garā kolonā, kuras ārējais diametrs ir 4.6 mm. Kolona aizpildīta ar  $C_{18}$  fāzi (*Labor MIM*) ar granulu izmēriem 10 mkm. Eluents satur 97 tilpuma vienības ūdens, 3 tilpuma vienības acetoniitrila un 0.4 tilpuma vienības trifluoretiķskābes. Mērījumus veica pie eluenta plūsmas 1 ml/minūtē. Detektēšanu veica pie 220 nm.

- 15 Polarizētās gaismas plaknes īpatnējo griešanas leņķi mērija ar *Perkin-Elmer 241* tipa aparātu.

Šķīdinātājus ietvaicēja vakuuma rotācijas ietvaicētājos, sildot uz ūdens vannas līdz 40°C, visos gadījumos.

- 20 Gala savienojumu aminoskābju analīzi veica *Biotronik LC 5001* aparātā. Paraugus hidrolizēja 24 stundas ilgi HCl šķīdumā ar koncentrāciju 6 moli/litrā pie 110°C.

Analīzes rezultāti ir ar precizitāti  $\pm 5\%$ . Hidrolīzes gaitā lielākā daļa acetamīdometilcisteīna ir pārveidota par 4-tiazolidīnkarbonskābi (Tin).

## 25 Pirmais piemērs

### (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH

- 5.81 g (10 mmoli) Fmoc-Cys-(Acm)-OPfp un 3.54 g (10.5 mmoli) H-Lys-(Boc)-OtBu.HCl šķīdina 20 ml dimetilformamīda 1.47 ml (10.5 mmoli) trietilamīna klātbūtnē. Pēc 4 stundām reakcijas  
 30 maisījumu atšķaida ar 100 ml etilacetāta. Maisījumu mazgā ar 50 ml ūdens, tad 3 reizes pa 30 ml 1 molāra HCl ūdens šķīduma un žāvē virs bezūdens nātrija sulfāta. Ietvaicē vakuumā. Pēc ietvaicēšanas iegūto eļļas veida vielu šķīdina karsējot 15 ml etilacetāta un šķīdumam pievieno 60 ml n-heksāna. Suspensiju uz nakti atstāj aukstumā, tad filtrē  
 35 un nogulsnes mazgā ar n-heksānu. Rezultātā iegūst 4.4 g (63%, rēķinot

11.

pēc aktīvā ēstera) Fmoc-Cys-(Acm)-Lys-(Boc)-OtBu.

Savienojuma kušanas temperatūra: 110 — 113°C

$[\alpha]_D^{20}$ : -22.8° (c=1.0 etanolā)

R<sub>f</sub>2: 0.60

5

1.6 g (2.29 mmoli) iegūtā dipeptīda apstrādā ar 15 ml dimetilformamīda, kas satur 10% dimetilamīna. Pēc tam maisījumu ietvaicē vakuumā, eļļainajam pārpalikumam vairākkārt nelielām porcijām uzlej n-heksānu, pēc tam maisījumu nostādina un beidzot nogulsnes šķīdina 10 ml dimetilformamīda.

10

Šķīdumam pievieno 1.5 g (2.6 mmoli) Fmoc-Asp-OtBu-OPfp, pēc 1 stundas maisījumu ietvaicē vakuumā, eļļveidīgam pārpalikumam vairākkārt pievieno n-heksānu, tad nostādina un beidzot kristalizē pievienojot diizopropilēteri. Rezultātā iegūst 1.52 g (76.1%) Fmoc-Asp-OtBu-Lys-(Boc)-OtBu. Nelielu daudzumu kristalizē no etilacetāta. Iegūtā savienojuma fizikālie rādītāji ir sekojoši:

15

Savienojuma kušanas temperatūra: 124 — 125°C

$[\alpha]_D^{20}$ : -31.8° (c=1.0 etanolā)

R<sub>f</sub>3: 0.70

20

1.4 g (1.61 mmoli) tripeptīda, kas iegūts pēc augstākaprakstītās metodes, apstrādā ar dimetilformamīdu, kas satur 10% dimetilamīna. Ietvaicē, un iegūtajam eļļainajam pārpalikumam vairākkārt nelielām porcijām uzlej n-heksānu, pēc tam maisījumu nostādina un beidzot nogulsnes šķīdina 6 ml dimetilformamīda. Šķīdumam pievieno 0.83 g

25

(1.75 mmoli) Boc-Glu(OtBu)-OPfp.

Pēc 1.5 stundām reakcijas maisījumu ietvaicē, pārpalikumu hromatogrāfiski attira kolonnā ar 30 ml silikagēla, eluēšanai izmanto 1. maisījumu. Tīrās frakcijas savāc, ietvaicē vakuumā. Rezultātā iegūto eļļu pārvērš cietā stāvoklī, kristalizējot no n-heksāna un diizopropilētera maisījuma.

30

Tā iegūst 1.22 g (81.2%) amorfu Boc-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Cys-(Acm)-Lys(Boc)-(OtBu).

$[\alpha]_D^{20}$ : -42.2° (c=1.0 etanolā)

R<sub>f</sub>2: 0.45

35

1.15 g (1.24 mmoli) aizsargāta tetrapeptīda, iegūta pēc

12.

augstākaprakstītās metodes, apstrādā ar 25 ml hlorūdeņraža šķīduma etiķskābē (4 moli/litrā). Pēc 30 minūtēm virsnogulšņu šķidrums nolej, uz eļļainā pārpalikuma uzlej ēteri, radušās nogulsnes šķīdina 15 ml ūdens un apstrādā ar acetāta cikla anjonapmaiņas sveķiem DOWEX 2x8.

Šķīdumu ietvaicē vakuumā un pārpalikumu ekstrahē ar etanolu. Jēlproduktu attīra hromatogrāfiski uz kolonnas ar 30 g silikagēla. Kā eluentu lieto 5. maisījumu. Tīrās frakcijas savāc, ietvaicē un pārpalikumu kristalizē no ūdens un etanola maisījuma, un tā iegūst 0.28 g (40.0%) amorfu (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH, kas satur kā piemaisījumu 2 — 3 % Glp-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH.

$[\alpha]_{20}^D$ : -33.7° (c=0.6 ūdenī)

R<sub>f6</sub>: 0.35

15

R<sub>f8</sub>: 0.25

Aminoskābju analīze:

Lys = 0.92 (1); Asp = 1.04 (1); Glu = 1.04 (1);

Cys = 0.36 (1); Tin = 0.32; NH<sub>3</sub> = 0.63.

#### Otrais piemērs

20 (1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH

4.5 g (5.17 mmoli) Fmoc-Asp(OtBu)-Cys(Acm)-Lys-(Boc)-OtBu apstrādā ar 40 ml dimetilformamīda, kas satur 10% dimetilamīna. Pēc 10 minūtēm reakcijas maisījumu ietvaicē vakuumā, pārpalikumu vairākas reizes mazgā ar n-heksānu. Suspensiju nostādina. Atdala 25 nogulsnes, kuras šķīdina 20 ml dimetilformamīda un pievieno 3.55 g (6.0 mmoli) Fmoc-Glu(OtBu)-OPfp.

Pēc stundas reakcijas maisījumu ietvaicē, pārpalikumu šķīdina 10 ml etilacetāta, pēc tam šķīdumu atšķaida ar 50 ml diizopropilētera. Nākošā dienā suspensiju filtrē un iegūst 4.46 g (81.8%) Fmoc-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Cys(Acm)-Lys-(Boc)-OtBu.

30 Savienojuma kušanas temperatūra: 111 — 115°C

$[\alpha]_{20}^D$ : -38.4° (c=1.0 etanolā)

R<sub>f2</sub>: 0.70

35

R<sub>f4</sub>: 0.90

13.

1.60 g (1.52 mmoli) augstākminētā aizsargātā tetrapeptīda apstrādā ar 15 ml dimetilformamīda, kas satur 10% dimetilamīna, reakcijas maisījumu ietvaicē vakuumā, eļļai, kas radusies pēc ietvaices, vairākas reizes uzlej n-heksānu un atstāj stāvēt. Tādā veidā iegūto tetrapeptīdu ( $R_f4 = 0.35$ ) šķīdina 8 ml dimetilformamīda un ievada reakcijā ar 0.59 g (2.0 mmoli) Glp-OPfp. Pēc 1 stundas reakcijas maisījumu ietvaicē un atlikumu atdala ar ēteri.

Rezultātā iegūst 1.0 g (69.7%) Glp-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Cys(Acm)-Lys-(Boc)-OtBu.

Savienojuma kušanas temperatūra: 158 — 160°C

$[\alpha]_D^{20}$ : -42.7° (c=1.0 etanolā)

$R_f1$ : 0.55

0.9 g (0.95 mmoli) iepriekšiegūtā savienojuma apstrādā 30 minūtes ilgi ar 10 ml 4 molāra hlorūdeņraža šķīduma etiķskābē. Tad šķīdumu atdala un nogulsnes mazgā ar ēteri.

Jēlproduktu attīra hromatogrāfiskā ceļā uz kolonas, aizpildītas ar 20 g silikagēla. Kā eluentu lieto 8. maisījumu. Tīrās frakcijas savāc, ietvaicē un pārpalikumu pārgulsnē no etanola un etilacetāta maisījuma, pašās beigās no metanola un etilacetāta maisījuma.

Rezultātā iegūst 0.33 g (51.4%) pentapeptīdu (1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH.

$[\alpha]_D^{20}$ : -22.8° (c=1.0 etanolā)

$R_f7$ : 0.35

25 Aminoskābju analīze:

Lys = 1.0 (1); Asp = 0.98 (1); Glu = 2.03 (1);

Cys = 0.31 (1); Tin = 0.45; NH<sub>3</sub> = 0.72.

### Trešais piemērs

(1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH

2.90 g (2.75 mmoli) Fmoc-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Cys(Acm)-Lys-(Boc)-OtBu apstrādā ar 25 ml dimetilformamīda, kas satur 10% dimetilamīna. Pēc 10 minūtēm reakcijas maisījumu ietvaicē un eļļaino pārpalikumu vairākas reizes apstrādā ar n-heksānu. Suspensiju nostādina. Cieto frakciju šķīdina 15 ml dimetilformamīda un šķīdumam

14.

pievieno 1.30 g (6 mmoli) Boc-Glp-OPfp. Pēc stundas reakcijas maisījumu ietvaicē un pārpalikumu apstrādā ar diizopropilēteri.

Rezultātā iegūti 2.62 g (91.2%) Boc-Glp-Glu(OtBu)-

5 Asp(OtBu)-Cys(Acm)-Lys-(Boc)-OtBu.

Savienojuma kušanas temperatūra: 96 — 101°C

$[\alpha]_D^{20}$ : -47.0° (c=1.0 etanolā)

R<sub>f</sub>5: 0.40.

10 2.50 g (2.39 mmoli) iepriekšiegūtā aizsargātā pentapeptīda apstrādā 2 stundas ilgi pie istabas temperatūras ar 40 ml trifluoretiķskābes un 5 ml anizola maisījumu. Pēc tam maisījumu ietvaicē līdz 10 ml un atšķaida ar ēteri. Suspensiju filtrē, nogulsnes mazgā ar ēteri, žāvē un šķīdina 30 mililitros ūdens.

15 Šķīdumu apstrādā ar 10 ml anjonu tipa jonapmaiņas sveķiem ar acetātanjonu DOWEX 2x8, tad filtrē un filtrātu ietvaicē vakuumā. Pārpalikumu pārkristalizē no ētera/metanola maisījuma.

Rezultātā iegūst 0.95 g (58.8%) pentapeptīdu ar formulu (1)

Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH.

$[\alpha]_D^{20}$ : -53.7° (c=1.0 metanolā)

20 Ceturtais piemērs

Ampula ar injekciju pulveri

25 500 mg pentapeptīda Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un 9.5 g laktozes šķīdina 80 ml destilēta ūdens (derīgs injekciju šķīdumu gatavošanai), pievieno 0.1 g metil-para-hidroksibenzoāta. Šķīduma daudzumu papildina līdz 100 ml ar destilētu ūdeni. Homogēno šķīdumu filtrē līdz sterīlam, sapilda ampulās pa 1 ml, liofilizē un pēc tam ampulas aizvāko ar plastmasas aizbāžņiem. Rezultātā iegūst ampulas, kas katra satur 5 mg aktīvā ingredienta.

30 Ja aktīvā ingredienta daudzums atšķiras no iepriekšminētā, tad ņem laktozi tādā daudzumā, lai kopējais ingredienta un laktozes daudzums būtu 10 g uz 100 ml šķīduma. Laktozes vietā var lietot mannītu.

35 Injicējot zāles, ampulas saturu šķīdina tādā daudzumā NaCl ūdens šķīduma, kas ļauj pagatavot izotonisku šķīdumu.

## IZGUDROJUMA FORMULA

1. Jauni oligopeptīdi atbilstoši formulām

(1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH

5 (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH,

kur ar Acm apzīmēta acetamīdometil-grupa, kā arī šo peptīdu sāļi, kas rodas pievienojot skābes, selektīvi inhibē asinsrades šūnu proliferāciju.

10 2. Oligopeptīds pēc punkta 1. ar formulu (1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un tā sāļi ar skābēm.

3. Oligopeptīds pēc punkta 1. ar formulu (2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH un tā sāļi ar skābēm.

15 4. Asinsrades šūnu proliferāciju selektīvi inhibējošs zāļu farmaceutiskais sastāvs *a t š ķ i r a s a r t o*, kas satur vienu vai vairākus peptīdus ar formulām (1) un (2) vai to sāļus ar skābēm terapeitiski iedarbīgā daudzumā maisījumā ar vienu vai vairākiem farmaceutiski saderīgiem šķīdinātājiem, pildvielām, stabilizatoriem, pH un osmotisko spiedienu ietekmējošām vielām, ekscipientiem un piedevām, kas atvieglina vai palīdz zāļu līdzekļa pagatavošanu.

20 5. Hemopoēzes šūnu proliferācijas zīdītājdzīvniekiem, ieskaitot cilvēku, selektīvas inhibēšanas metode *a t š ķ i r a s a r t o*, kas zīdītājdzīvniekiem tiek ievadīta terapeitiski iedarbīga deva peptīda ar formulu (1) vai (2), vai deva šo peptīdu sāļu ar skābēm, tīrā veidā vai zāļu farmaceutisko sastāvu formā.

25 6. Asinsrades šūnu hemopoēzi inhibējošu jaunu peptīdu, atbilstošu formulām

(1) Glp-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH

(2) H-Glu-Asp-Cys-(Acm)-Lys-OH,

30 un to sāļu ar skābēm iegūšanas metode *a t š ķ i r a s a r t o*, kas pakāpeniski pagarina aizsargātu starproduktu (no C-gala aizsargātu aminoskābju atvasinājumu) ķēdes peptīdiem ar formulām (1) un (2), izmantojot secīgu aktīvo ēsteru piesaistīšanu un alfa-aminogrupas izdalīšanu ar bāziska katalizatora palīdzību, aizsargājot nercaģējošās amino- un karboksilgrupas ar vājas acidolizes ceļā viegli atšķēlamām

35

grupām, un aizsargājot merkaptogrupu ar acetamīdometilgrupu, ko arī atšķeļ ar vāju acidolīzi, un, ja tas nepieciešams, pārveidojot ar skābēm brīvos oligopeptīdus ar formulām (1) un (2) par to atbilstošiem sāļiem.

5 7. Metode pēc punkta 6., atšķiras ar to, ka aktīvā ēstera saistīšanas stadijā tiek izmantotas ar pentafluorfenilēsteri aizsargātas aminoskābes.

8. Metode pēc punkta 6. un punkta 7., atšķiras ar to, ka ir izmantoti aizsargāti aminoskābju atvasinājumi, kur nereagējošās karboksilgrupas aizsargātas ar terc-butilgrupām.

10 9. Iegūšanas metode zāļu farmaceitiskam sastāvam, kas selektīvi inhibē hemopoēzes šūnu proliferāciju, atšķiras ar to, ka, sajaucot vienu vai vairākus peptīdus atbilstošus formulām (1) un (2) brīvā veidā vai arī pievienoto skābju sāļu veidā, kas iegūti saskaņā ar jebkuru no punktiem 6-8, kopā ar vienu vai vairākiem farmaceitiski saderīgiem šķīdinātājiem, stabilizātoriem, pH un osmotisko spiedienu ietekmējošiem aģentiem, ekscipientiem un piedevām, kas dod iespēju pagatavot, vai atviegļina zāļu līdzekļa pagatavošanu, un zāļu farmaceitiskā sastāva pagatavošanu.

20