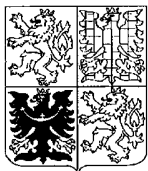


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.02.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.02.1998 06.02.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/020086 1998/9802681**

(33) Země priority: **US GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/02583**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/39747**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2656

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 51/08

A 61 P 7/02

//(A 61 K 103:10, A 61 K 123:00)

(71) Přihlašovatel:

DIATIDE, INC., Londonderry, NH, US;

(72) Původce:

Dean Richard T., Bedford, NH, US;

Lister-James John, Bedford, NH, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Farmaceutický prostředek na bázi bibapcitidinu
pro léčení trombózy**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje nové reagentie prekursoru, které se používají při výrobě zobrazovacích látek, které jsou odvozené od apcitidu. Zobrazovací látky, které jsou vyrobené z reagentií prekursoru tohoto řešení jsou užitečné k in vivo detekci a diagnostice trombů. Reagentie prekursoru tohoto řešení se také mohou používat při výrobě antitrombotických látek odvozených od apcitidu. Přítomnost volných karboxylových skupin zvyšuje rozpustnost těchto reagentií oproti bibapcitidu ve vodném médiu.

CZ 2000 - 2656 A3

Farmaceutické prostředky odvozené od bibapcitudu pro zobrazování a léčbu
trombů

Oblast techniky

Tento současný vynález se týká oblasti diagnostického zobrazování trombů. Vynález se týká zvláště farmaceutických prostředků používaných k zobrazování trombů. Vynález se také týká oblasti léčby trombózy, ke které se používají léky vyrobené z nových prekurzorových reagentů.

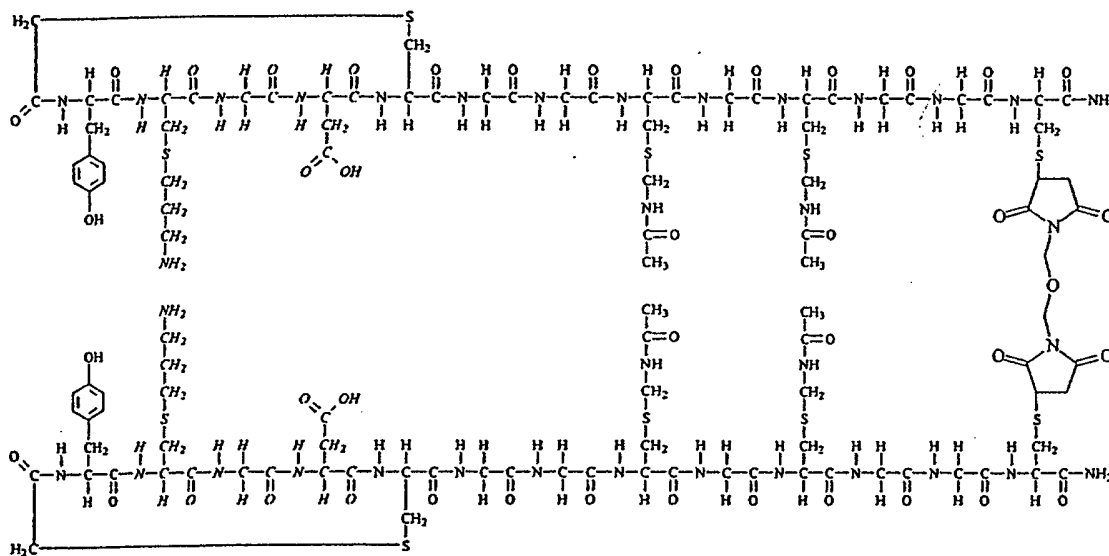
Dosavadní stav techniky

Trombóza a tromboembolismus, zvláště trombóza hlubokých žil (Deep vein thrombosis = DVT) a plicní embolie (PE) patří mezi běžné klinické stavy, které doprovází významná nemocnost a úmrtnost. Odhaduje se, že v U.S.A. má přibližně 5 miliónů pacientů za rok zkušenost s jednou nebo více epizodami trombózy hlubokých žil a vyskytuje se 500 000 případů plicní embolie, které jsou vedou k 100 000 úmrtí. Také se odhaduje, že přes 90 % všech plicních embolií vzniká z trombózy hlubokých žil dolních končetin. Protisrážlivá léčba může tyto stavy účinně léčit, pokud je zahájena dostatečně včas. Avšak tuto léčbu doprovází vysoká rizika (například vnitřní krvácení), která předchází nezbytnému profylaktickému podání. Dokonalejší způsoby trombolytického zásahu (jako je například podávání rekombinantního aktivátoru tkáňového plasminogenu nebo streptokinázy) se mohou použít u akutních případů, avšak tyto způsoby přinášejí mnohem vyšší rizika. Navíc účinné klinické používání těchto způsobů vyžaduje, že je stanoveno místo trombu tak, aby se mohl monitorovat účinek léčby.

Z těchto důvodů jsou vysoce žádoucí rychlé způsoby lokalizace trombů *in vivo*, nejvýhodněji při použití neinvazivních způsobů. V minulosti se používaly metody kontrastní venografie a kompresní B-mode ultrazvuk ke stanovení míst trombózy hlubokých žil; výběr použité metody závisel na předpokládané lokalizaci trombu. Bohužel však jsou dřívější metody invazivní a obě jsou pro pacienta nepříjemné. Navíc tyto metody jsou pro mnoho případů nevhodné nebo neposkytují přesné výsledky. Mezi

současné metody, které se používají k diagnostice plicní embolie, patří rentgen, elektrokardiogram (EKG), arteriální tlak kyslíku, perfusní a ventilační plicní scany, a plicní angiografie. Žádná z těchto novějších invazivních metodik není schopna poskytovat jednoznačnou diagnostiku.

V poslední době byly dokončené klinické pokusy na scintigrafické zobrazování akutní trombózy hlubokých žil pomocí peptidu apcitudu, radioaktivně označeného ^{99m}Tc , který se váže na GPIIb/IIIa receptor krevních destiček, jenž je součástí trombů a tím poskytuje zobrazovací látku specificky cílenou na tromby. Souprava k výrobě apcitudu radioaktivně označeného ^{99m}Tc , ACUTESTTM je tvořena bibapcitudem jehož chemický vzorec I je uveden níže.



(I),

Bibapcited a jeho radioaktivní značení je popsáno v patentu U.S. Pat. Nos. 5,508,020 a 5,645,815; a dále USSN 08/253,317; a WO 93/23085; WO 93/25244 a WO 95/33496. WO 94/07918 popisuje, že bibapcited může být také použit v neznačené formě jakožto antitrombotická látka.

Bibapcited je dimer monomerů apcitudu, který je také popsán ve výše uvedených U.S. patentech a žádostech a mezinárodních patentových žádostech. Dimer bibapcited

vzniká bismaleimidovou vazbou cysteinů karboxylových konců ze dvou monomerů apcitudu. Monomerický apcitud se sloučí s ^{99}TcO a komplex apcitud/ ^{99}Tc popisuje Zheng a kol., Abstract 336, 213th American Chemical Society Meeting, Duben 13-17, 1997.

Podstata vynálezu

Současní vynálezci objevili dva nové dimery apcitudu, bibapcitud monokarboxylát a bibapcitud dikarboxylát, které jsou přítomny ve vodních roztocích bibapcitudu při pH vyšším než 5. Tyto nové dimery apcitudu se mohou použít jako prekurzory při výrobě apcitudu značeného $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Jedna část vynálezu poskytuje reagentii prekurzoru, která obsahuje bibapcitud monokarboxylát.

Další část vynálezu poskytuje reagentii prekurzoru, která obsahuje bibapcitud dikarboxylát.

Další část vynálezu poskytuje prostředek, který obsahuje bibapcitud monokarboxylát.

Další část vynálezu poskytuje prostředek, který obsahuje bibapcitud dikarboxylát.

Další část vynálezu poskytuje farmaceutický prostředek, která obsahuje bibapcitud monokarboxylát a farmaceuticky přijatelný nosič.

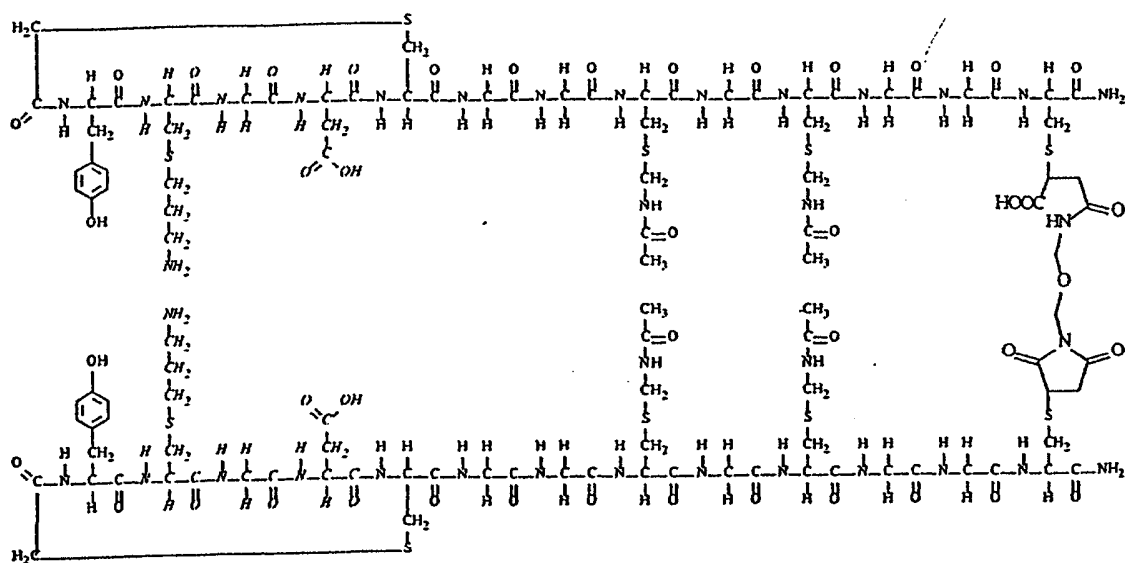
Další část vynálezu poskytuje farmaceutický prostředek, který obsahuje bibapcitud dikarboxylát a farmaceuticky přijatelný nosič.

Podrobný popis vynálezu

Patent a odborná literatura, která je součástí referencí, jsou založené na znalostech dostupných znalcům z oboru. Vydané U.S. patenty a povolené žádosti jsou zde zahrnuty v referencích.

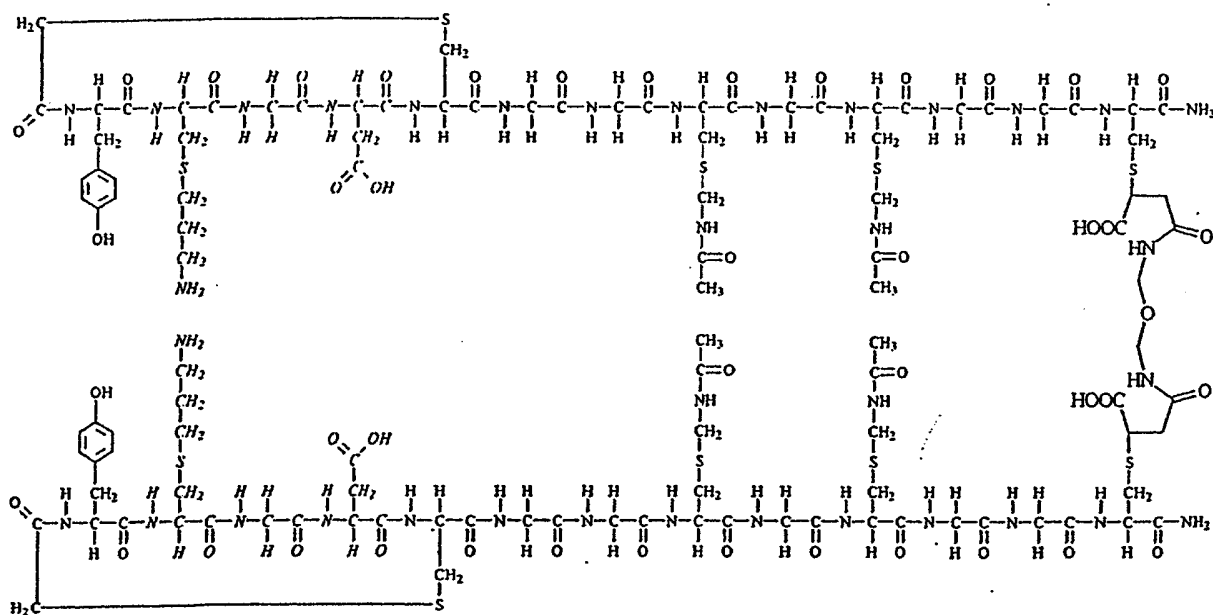
Farmaceutický prostředek tohoto vynálezu poskytuje nové reagentie prekurzoru, bibapcitud monokarboxylát a bibapcitud dikarboxylát, pro výrobu jak zobrazovacích látek tak i antitrombotických látek odvozených od bibapcitudu.

Chemický vzorec (I) bibapcitid monokarboxylátu je znázorněn níže:



(I),

Chemický vzorec (II) bibapcitid dikarboxylátu je znázorněn níže:



(II),

Přítomnost volných karboxylových skupin zajišťuje reagencím prekursoru vyšší rozpustnost než má bibapcitid ve vodních médiích. V tabulce 1 viz níže je například

znázorněno porovnání rozpustnosti bibapcitudu a bibapcidid dikarboxylátu v 0,1 M fosfátovém pufru při různých hodnotách pH, při teplotě místnosti.

Tabulka 1

Rozpustnosti

	Bibapcidid	Bibapcidid-(COO)⁻₂
pH 7	< 0,05 mg/ml	1,3 mg/ml
pH 8	< 0,05 mg/ml	1,3 mg/ml
pH 9	< 0,05 mg/ml	1,3 mg/ml

Je k dispozici bibapcidid od firmy Diatide, Inc., Londonderry, NH U.S.A. Bibapcidid se může vyrábět například při použití syntézy peptidu na pevné fázi, jak je uvedeno v U.S. patentech č. 5,508,020 a 5,645,815; v USSN 08/253/317 a WO 93/23085; WO 93/25244; WO 94/23758; WO 94/07918 a WO 95/33496. Bibapcidid se s výhodou vyrábí při pH nižším než 4 a izoluje se jako trifluoroctová sůl. Bibapcidid trifluoracetát se rozpouští za použití acetonitrilu nebo ethanolu a vody nebo vodného roztoku před formulací. Pro použití u savců jako je člověk je upřednostňováno rozpouštění v etanolu a vodě nebo ve vodném roztoku.

Bibapcidid monokarboxylát a bibapcidid dikarboxylát se výhodně vyrábí z bibapcitudu zvyšováním pH rozpuštěného bibapcitudu za použití vhodného pufru jako je například fosfátový pufr přizpůsobený na požadované pH, jak je znázorněno na Příkladu 1 nebo použití bikarbonátového pufru jak je popsáno v Příkladu 2. Nejvýhodněji se bibapcidid monokarboxylát a bibapcidid dikarboxylát vyrábějí z lyofilizovaného bibapcidid trifluoracetátu s pufrém při fyziologickém pH. K úpravě pH bibapcitudu při výrobě bibapcidid monokarboxylátu a/nebo bibapcidid dikarboxylátu se může požit jakýkoliv pufr. Například fosfátový pufr, bikarbonátový pufr, borátový pufr, citrátový pufr, sulfátový pufr apod. může být použit k výrobě reagentů prekursoru tohoto vynálezu. Bibapcidid monokarboxylát a/nebo bibapcidid dikarboxylát se alternativně může vyrábět enzymaticky, například použitím hydrolázy. Bibapcidid monokarboxylát a

bibapcitid dikarboxylát se může izolovat a purifikovat známými způsoby, jako je například HPLC, jak je uvedeno v Příkladu 1 a 2.

Stability bibapcitudu, bibapcitid monokarboxylátu a bibapcitid dikarboxylátu při různých hodnotách pH jsou uvedeny níže v tabulce 2. Stabilita uvedená v tabulce 2 znamená 95% stabilitu při teplotě místnosti.

Tabulka 2

Stability

pH	Bibapcitid	Bibapcitid-(COO ⁻)	Bibapcitid-(COO ⁻) ₂
< 4	> 5 hodin	minuty	minuty
4-5	1-5 hodin	1 hodina	1 hodina
5-6	1 hodina	> 5 hodin	> 5 hodin
6-7	minuty	> 5 hodin	> 2 dny
7-8	minuty	1 hodina	> 5 hodin
> 8	minuty	minuty	1 hodina

Reagencie prekursoru tohoto vynálezu se dodávají ve formě farmaceutického prostředku. Farmaceutický prostředek s výhodou obsahuje bibapcitid monokarboxylát nebo bibapcitid dikarboxylát. Výhodněji farmaceutický prostředek tohoto vynálezu obsahuje bibapcitid monokarboxylát i bibapcitid dikarboxylát. Nejvýhodněji farmaceutický prostředek tohoto vynálezu obsahuje bibapcitid monokarboxylát i bibapcitid dikarboxylát i bibapcitid. Množství bibapcitid monokarboxylátu i bibapcitid dikarboxylátu i bibapcitudu ve farmaceutickém prostředku je různé podle jednotlivých částí tohoto vynálezu. Komerčně vyráběný bibapcitid, prodáváný pod jménem ACUTESTTM, typicky obsahuje mezi 10 % a 50 % bibapcitid monokarboxylátu a mezi 3 % a 12 % bibapcitid dikarboxylátu.

Farmaceutický prostředek tohoto vynálezu může dále obsahovat farmaceuticky přijatelný diluent nebo nosič, jako jsou například různé druhy příslušného albuminu. Pod

zde použitým pojmem „farmaceuticky přijatelný diluent nebo nosič“ patří rozpouštědla, disperzní média, antibakteriální a protiplísňové látky, izotonické látky, inhibitory enzymů apod. V oboru je používání takovýchto médií a látek dobře známo. Například infúze chloridu sodného a Ringerova roztoku patří mezi běžně používané diluenty. Reagencie prekursoru se vyrábějí jakožto sterilní, apyrogenní, vodné roztoky vhodné pro parenterální použití, které mohou být volitelně skladovány v lyofilizované formě a rekonstituovány uživatelem. Příprava takovýchto roztoků vhodných pro parenterální použití, která mají požadované pH, izotonicitu a stabilitu apod. je v oboru známa.

Nové reagencie prekursoru tohoto vynálezu se používají k výrobě diagnostických nebo léčebných látek, které jsou odvozeny od bibapcitudu. Mezi takovéto látky patří scintigrafické zobrazující látky pro záchyt a diagnostiku trombů, tak jak je podrobněji popsáno v U.S. patentech č. 5,508,020; 5,645,815; v USSN 08/253,317 a ve WO 93/23085; WO 93/25244; WO 94/23758; a WO 95/33496. Bibapcitud monokarboxylát a/nebo bibapcitud dikarboxylát se rovněž může použít k výrobě antitrombotických látek, jak je uvedeno ve WO 94/07918. Reagencie prekursoru tohoto vynálezu se mohou také používat k výrobě antitrombotických látek, které obsahují cílový peptid odvozený od bibapcitudu, který je kovalentně navázán na trombolytickou proteinázu, jak je podrobně popsáno v podaných žádostech USSN 08/753,781 a USSN 08/982,981.

Pokud se reagencie prekursoru tohoto vynálezu se používají k výrobě značených diagnostik nebo léčebných látek odvozených od bibapcitudu, může se použít jakákoliv značkovací látka, která generuje signál. Takovéto značkovací látky mohou být přímo inkorporovány do nebo spojeny s reagenciemi prekursoru tohoto vynálezu jakýmkoliv způsobem, který je pro toto značení vhodný, buď přímou kovalentní nebo nekovalentní vazbou s reagenciemi prekursoru nebo nepřímou kovalentní nebo nekovalentní vazbou. Mezi vhodné značkovací látky patří radioaktivní značkovací látky, fluorescenční značkovací látky, paramagnetické značkovací látky, těžké kovy nebo prvky vzácných zemin, které jsou vhodné pro použití při počítačové tomografii apod. Radioaktivní značkovací látky jsou upřednostňovány. Ještě výhodnější pro použití v tomto vynálezu jsou γ -emitující radionuklidy jako je například ^{123}I , ^{67}Ga , ^{111}In a $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Nejvýhodnější je $^{99\text{m}}\text{Tc}$, který se používá k označování reagiencí prekursoru tohoto vynálezu. Pokud se používá jako značkovací látka $^{99\text{m}}\text{Tc}$, přidává se $^{99\text{m}}\text{Tc}$ k farmaceutickému prostředku, který obsahuje bibapcitud monokarboxylát a/nebo bibapcitud dikarboxylát při pH vyšším

než 5 a výsledná směs se zahřívá po určitou dobu při teplotě, která stačí ke vzniku monomeru apcitudu a radioaktivního označení zmíněného monomeru. Směs farmaceutického prostředku, která obsahuje bibapcitid monokarboxylát a/nebo bibapcitid dikarboxylát a ^{99m}Tc , se s výhodou ohřívá po dobu 15 minut ve vroucí vodní lázni za vzniku scintigrafické zobrazující látky, která obsahuje apcitud značený ^{99m}Tc .

Značené nebo neznačené znázorňování trombů nebo antitrombotické látky se vyrábějí tak, že se živým savcům mohou používané reagentie prekursoru tohoto vynálezu podávat nitrožilní cestou v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem. Podle tohoto vynálezu zobrazovací nebo antitrombotické látky se vyrábějí z farmaceutických prostředků, které obsahují bibapcitid monokarboxylát a/nebo bibapcitid dikarboxylát a které se podávají s výhodou v oddělených injekčních dávkách v jakémkoliv tradičním médiu určenému k nitrožilnímu podávání jako je například médium vodného fyziologického roztoku nebo v médiu krevní plasmy. Množství roztoku, který se používá pro jednotlivou injekční dávku, je od 0,01 ml do 10 ml.

Diagnostické nebo léčebné látky, které se vyrábějí z farmaceutických prostředků a které obsahují bibapcitid monokarboxylát a/nebo bibapcitid dikarboxylát se savcům s výhodou podávají v diagnosticky nebo léčebně účinném množství ve stádiu možného rizika trombotického onemocnění nebo v případě tohoto onemocnění. Zde použitý výraz „diagnosticky účinné množství“ znamená celkové množství každé aktivní složky farmaceutického prostředku diagnostické látky, které se vyrábí z bibapcitid monokarboxylátu a/nebo bibapcitid dikarboxylátu, nebo celkové množství tohoto prostředku, které je podáno ve formě diagnostické látky a které je má schopnost vytvořit měřitelný signál lokalizovaný *in vivo* v místě trombu. Zde použitý výraz „léčebně účinné množství“ znamená celkové množství každé aktivní složky farmaceutického prostředku léčebné látky, které se vyrábí z bibapcitid monokarboxylátu a/nebo bibapcitid dikarboxylátu, nebo celkové množství tohoto prostředku, které je podáno ve formě léčebné látky, které vykazuje dostatečně významnou výhodu pro pacienta, tj. snížení výskytu a závažnosti trombů v porovnání se skupinou pacientů, kteří tuto léčebnou látku nedostávali, jak je stanoveno ošetřujícím lékařem. Pokud se podává jedinci aktivní přísada samostatně pojem znamená vlastní přísadu. Pokud se podává v kombinaci, pojem znamená kombinované množství aktivních přísad, které mají výsledný diagnostický nebo léčebný účinek, ať už se podávají v kombinaci, po sobě nebo

současně. Například zobrazovací látky nebo léčebné látky, které se vyrábějí z bibapcitid monokarboxylátu a/nebo bibapcitid dikarboxylátu se mohou podávat v dávce od 0,1 do 10 mg/kg tělesné hmotnosti a podávají se nitrožilně buď najednou jako bolus nebo částečně jako bolus s následnou infuzí po dobu 1 až 2 hodin. Pokud se radiačně značené diagnostické nebo léčebné látky vyrábějí z bibapcitid monokarboxylátu a/nebo bibapcitid dikarboxylátu, jednotlivá podávaná dávka má radioaktivitu od 0,01 mCi do 100 mCi, s výhodou od 1 mCi do 20 mCi. Po nitrožilním podání se sleduje místo trombu určitým způsobem radiačního zobrazování *in vivo*. Způsoby výroby bibapcitid monokarboxylátu a bibapcitid dikarboxylátu jsou podrobněji uvedeny v následujících příkladech, které jsou uvedeny pro znázornění nikoliv však limitujícím způsobem.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

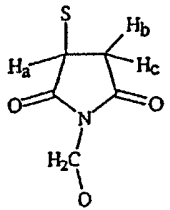
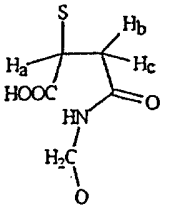
Syntéza bibapcitid monokarboxylátu

Bibapcitid trifluoracetát (100 mg) se suspenduje v 10 ml acetonitrilu (CH_3CN), nechá se působit ultrazvuk po dobu jedné minuty a potom se naředí pomocí 40 ml vody (H_2O). Peptid se rozpustí kompletně po přidání vody (H_2O). K tomuto roztoku se přidá 40 ml 0,05 M fosfátu sodného při pH 7, což způsobí, že se roztok lehce zakalí. pH roztoku peptidu je 7,2. Roztok se nechá inkubovat ve vroucí vodní lázni po dobu tří minut, čímž vymizí zakalení. Pomocí analýzy HPLC se stanoví přítomnost bibapcitid dikarboxylátu, bibapcitid monokarboxylátu a bibapcidu v přibližných množstvích 26 %, 54 % a 14 %. Reakční roztok se přidal přímo na sloupci 47 x 300 mm delta-Pak C18 ustálené v 10 mmol hydrogenuhličitanu amonného (NH_4HCO_3) upraveného na pH 6 až 6,5 pomocí tuhého CO_2 (pohyblivá fáze C). Sloupec se poléval pohyblivou fází C po dobu pěti minut, následoval gradient od 100/0 C/D do 90/10 C/D po dobu pěti minut a potom od 90/10 C/D do 80/20 C/D po dobu 30 minut (pohyblivá fáze D = 10 mmol NH_4HCO_3 v 75/25 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ při pH 6 až 6,5). HPLC pufrů se průběžně udržovaly při pH 6 až 6,5 pomocí tuhého CO_2 . Frakce se sbíraly na základě monitorování efluentu při 220 nm. Frakce se potom analyzovaly pomocí analytické HPLC a ty, které byly zjištěny,

že obsahují čistý (≥ 98 %) bibapcitid monokarboxylát se sloučily a lyofilizovaly tak, aby se získalo přibližně 30 mg bibapcitid monokarboxylátu (30% výnos) ve formě soli uhličitanu amonného, bílého prášku. Takto provedená analýza NMR bibapcitid monokarboxylátu (20 % $\text{CD}_3\text{CN}/80\%\text{H}_2\text{O}$, pH 6, $T = 20$ °C) je uvedena v tabulce 3 viz níže.

Tabulka 3

Chemické údaje (δ , ppm) pro bibapcetid monokarboxylát

Aminokyselina	NH (Amid)	α -CH	Další protony v aminokyselině	
D-Tyr ¹	8,57	4,54	3,00 (CH ₂)	3,37, 3,43 (CO-CH ₂ -S) 6,85, 7,15 (aromatic)
Apc ²	8,45	4,49	2,81, 2,89 (CH ₂)	3,06 (CH ₂ -NH ₂) 2,50 (-S-CH ₂) 1,90 (CH ₂ -CH ₂ -CH ₂)
Gly ³	8,36	3,09, 4,90		
Asp ⁴	8,40	4,63	2,67 (CH ₂)	
Cys ⁵	8,33	4,46	3,00, 3,08	
Gly ⁶	8,41	4,00		
Gly ⁷	8,16	4,02		
Cys ⁸	8,30	4,61	2,95, 3,13	
Gly ⁹	8,47	4,01		
Cys ^{10*}	8,25; 8,26	4,62; 4,64	2,93, 3,13; 2,94, 3,14	
Acm ^{8,10}	8,50	4,33	2,03 (CH ₃)	
Gly ¹¹	8,50	3,99		
Gly ¹²	8,23	4,01		
Cys ^{13*}	8,31; 8,54	4,65; 4,52	3,25; 3,05	
C-terminal amide	7,65, 7,11; 7,60, 7,11; 7,64, 7,19			
			H _a 4,11, 4,08* H _b 3,37, 3,35* H _c 2,72, 2,69* CH ₂ 5,12, 4,69*	
			H _a 3,66, 3,62* H _b 2,86, 2,84* H _c 2,62, 2,60* CH ₂ 5,12, 4,69* NH 8,50, 8,63*	

* Diasterometrické rezonance

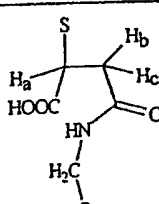
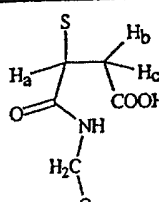
Příklad 2

Syntéza bibapcitid dikarboxylátu

Bibapcitid trifluoracetát (100 mg) se suspenduje v 5 ml CH_3CN , nechá se působit ultrazvuk po dobu jedné minuty a potom se naředí pomocí 25 ml H_2O . Peptid se rozpustí kompletně po přidání H_2O . K tomuto roztoku se přidá jeden ml nasyceného hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO_3) a 0,5 ml 1 M uhličitanu draselného (K_2CO_3). pH roztoku peptidu bylo pomocí pH papírku stanoveno na 8,5. Roztok se lehce zakalí po přidání K_2CO_3 , zakalení pomalu vymizí během dvou hodin při teplotě místnosti. Po uplynutí tří hodin bylo stanoveno analýzou HPLC, že reakce obsahuje 84 % bibapcitid dikarboxylátu. Reakční roztok se přidal přímo na sloupce 47 x 300 mm delta-Pak C18 ustálené v 10 mmol hydrogenuhličitanu amonného (NH_4HCO_3) upraveného na pH 6 až 6,5 pomocí tuhého CO_2 (pohyblivá fáze C). Sloupec se poléval 100% pohyblivou fází C po dobu pěti minut, následoval gradient od 100/0 C/D do 90/10 C/D po dobu pěti minut a potom od 90/10 C/D do 70/30 C/D po dobu 30 minut. HPLC pufrů se průběžně udržovaly při pH 6 až 6,5 pomocí tuhého CO_2 . Frakce se sbíraly na základě monitorování efluentu při 220 nm. Frakce se potom analyzovaly pomocí analytické HPLC a ty, které byly zjištěny, že obsahují čistý (≥ 98 %) bibapcitid dikarboxylát se sloučily a lyofilizovaly tak, aby se získalo přibližně 54 mg bibapcitid dikarboxylátu (obsah peptidu 86 %, izolovaný výnos 53 %) ve formě soli uhličitanu amonného, bílého prášku. Takto provedená analýza NMR bibapcitid dikarboxylátu (20% CD_3CN /80% H_2O , pH 6, $T = 20^\circ\text{C}$) je uvedena v tabulce 4 viz níže.

Tabulka 4

Chemické údaje (δ , ppm) pro bibapcetid dikarboxylát

Aminokyselina	NH Amid	α -CH	Další protony v aminokyselině	
D-Tyr ¹	8,53	4,53	3,01 (CH ₂)	3,39, 3,42 (CO-CH ₂ -S) 6,86, 7,17 (aromatic)
Apc ²	8,37	4,51	2,83, 2,91 (CH ₂)	3,06 (CH ₂ -NH ₂) 2,51 (-S-CH ₂) 1,92 (CH ₂ -CH ₂ -CH ₂)
Gly ³	8,34	3,88, 4,09		
Asp ⁴	8,37	4,66	2,75 (CH ₂)	
Cys ⁵	8,30	4,45	3,00, 3,08	
Gly ⁶	8,35	3,98		
Gly ⁷	8,10	4,01		
Cys ⁸	8,27	4,61	2,97, 3,14	
Gly ⁹	8,41	4,00		
Cys ¹⁰	8,21	4,63	2,96, 3,14	
Acm ^{8,10}	8,45	4,33	2,03 (CH ₃)	
Gly ¹¹	8,47	4,01		
Gly ¹²	8,18	4,00		
Cys ^{13*}	8,30; 8,50	4,54; 4,53	3,15; 3,09	
C-terminal amide*	7,63, 7,05; 7,58, 7,05			
			H _a 3,70, 3,67* H _b 2,86, 2,85* H _c 2,63, 2,62* CH ₂ 4,68 NH 8,54	Major hydrolysis product (>80% by NMR)
			H _a 3,78, 3,75* H _b 2,89, 2,88* H _c 2,69, 2,67* CH ₂ 4,73, 4,72* NH 8,80, 8,74*	Minor hydrolysis product (<20% by NMR)

* Diasterometrické rezonance

Je pochopitelné, že následující objev zdůrazňuje určité specifické části tohoto vynálezu a že všechny modifikace nebo jejich ekvivalenty patří do rámce tohoto vynálezu tak, jak je uvedeno v přiložených patentových nárocích.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Prekurzorové činidlo vyznačující se tím, že obsahuje bibapcitid monokarboxylát.
2. Prekurzorové činidlo vyznačující se tím, že obsahuje bibapcitid dikarboxylát.
3. Prostředek vyznačující se tím, že obsahuje bibapcitid monokarboxylát.
4. Prostředek podle nároku 3 vyznačující se tím, že dále ještě obsahuje bibapcitid dikarboxylát.
5. Prostředek podle nároku 4 vyznačující se tím, že dále ještě obsahuje bibapcitid.
6. Prostředek vyznačující se tím, že obsahuje bibapcitid monokarboxylát.
7. Farmaceutický prostředek vyznačující se tím, že obsahuje bibapcitid monokarboxylát a farmaceuticky přijatelný nosič.
8. Farmaceutický prostředek podle nároku 7 vyznačující se tím, že dále ještě obsahuje bibapcitid dikarboxylát.
9. Farmaceutický prostředek podle nároku 8 vyznačující se tím, že dále ještě obsahuje bibapcitid.
10. Farmaceutický prostředek vyznačující se tím, že obsahuje bibapcitid dikarboxylát a farmaceuticky přijatelný nosič.