

(19) DANMARK

(11) DK 175103 B1



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: C 07 K 17/10 A 61 K 38/58 C 07 K 14/815

(21) Patentansøgning nr: PA 1989 02707

(22) Indleveringsdag: 1989-06-02

(24) Løbedag: 1989-06-02

(41) Alm. tilgængelig: 1989-12-05

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-06-01

(30) Prioritet: 1988-06-04 DE 3819079

(73) Patenthaver: **Aventis Pharma Deutschland GmbH, Brüningstrasse 50, D-65926 Frankfurt am Main, Tyskland**

(72) Opfinder: **Peter Crause, Schopenhauerstrasse 31, 6050 Offenbach, Tyskland**

Paul Habermann, Rossertstrasse 35, 6239 Eppstein/Taunus, Tyskland

Martin Kramer, Fichtestrasse 4, 6200 Wiesbaden, Tyskland

Rainer Obermeier, Langenhainer Weg 14, 6234 Hattersheim am Main, Tyskland

Klaus Sauber, Koenigsteiner Strasse 144, 6232 Bad Soden am Taunus, Tyskland

Dominique Tripier, Im Kirschgarten 16, 6239 Eppstein/Taunus, Tyskland

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Hirudin-derivater, deres fremstilling og anvendelse**

Opfindelsen angår hirudin-derivater som angivet i krav 1, der har en forhalet virkning, samt en fremgangsmåde til fremstilling heraf, angivet i krav 11, og deres anvendelse, angivet i krav 12.

5 Hirudiner er f.eks. kendt fra EP-A 142 860, EP-A 158 564, EP-A 158 986, EP-A 168 342, EP-A 171 024, EP-A 193 175, EP-A 200 655, EP-A 209 061, EP-A 227 938, DE 3 445 517 A1, DE 3 805 540.6 og Chang, FEBS, bd. 164 (1983) 307. Chang har bl.a. vist, at C-terminale forkortelser
10 kraftigt hæmmer hirudins antithrombotiske virkning. Også hirudiners betydning for antikoagulationsbehandlingen har længe været beskrevet (jff. f.eks. P. Walsmann og F. Markwardt, Pharmazie, 36 (1981) 653). De inhiberer således specifikt thrombin, men er i øvrigt farmakologisk indifferente,
15 dvs. man har hidtil ikke observeret uønskede bivirkninger.

Som en ulempe for den medicinske anvendelse som thromboseprofylaktikum kan dog anses hirudinernes relativt korte opholdsvarighed i dyre- og menneskekroppe (jff. Richter et al., Haematol. 115 (1988) 64; Markwardt et al., Pharmazie 43
20 (1988) 202). I EP-A-0 187 361 beskrives der præparater med forhalet virkning ved tilsætning af et depotbærestof. Veronese et al. (Applied Biochemistry and Biotechnology, bd. 11, 141-152, 1985) beskriver PEG-derivatiseringen af enzymerne ribonuclease og superoxid-dismutase.

25 Det er således formålet med opfindelsen at finde hidtil ukendte hirudin-derivater, der har en længere halveringstid, eller hvis elimination er ringe.

Man opnåede overraskende dette formål ved hjælp af hirudin-derivater, der er dannet ud fra hirudin eller fysiologisk acceptable salte heraf og et bærestof.
30

I betragtning som hirudiner kommer f.eks. de fra de ovenfor citerede litteratursteder beskrevne forbindelser, især de forbindelser, der er beskrevet i EP-A 171 024, EP-A 158 986, EP-A 209 061 og DE 3 805 540.6, såsom

0 1 10
 Leu-Thr-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-
 20
 5 Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-
 30 40
 Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-
 50
 Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-
 10 60
 Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln.

Disse hirudiner kan fremstilles efter af fagfolk almindeligt kendte metoder fra peptidkemien, jf. f.eks.

- 15 Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bind 15/2, fortrinsvis ved hjælp af en fastfasesyntese, som det f.eks. er beskrevet af B. Merifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963) eller af R.C. Sheppard, Int. J. Peptide Protein Res. 21, 118 (1983), eller ved hjælp af ækvivalente kendte metoder.
- 20 Alternativt kan de nævnte hirudiner også fås ved hjælp af af fagfolk kendte genteknologiske metoder.

Endvidere kommer følgende ved hjælp af genteknologiske metoder ændrede hirudiner i betragtning. Fordelagtigt sådanne, hvor f.eks. to af de tre naturligt i sekvensen fore-

25 kommende lysiner er erstattet med en naturlig aminosyre, fortrinsvis Asg, Asn. Endvidere også sådanne hirudiner, der er forandret ved hjælp af direkte N- (fortrinsvis Lys) eller C-terminal (fortrinsvis Met) forlængelse. Ved en N-terminal-forlængelse erstattes de i sekvensens forløb forekommende

30 lysiner med en anden naturlig aminosyre, fortrinsvis Asn, Arg.

Som bærestof anvendes opløselige bærestoffer, især polysaccharider, f.eks. dextraner (MW 20000-75000 dalton), fortrinsvis dextraner (MW 70000 dalton) - Laevaner, hepariner

35 (MW 6000-20000 dalton) eller hepariner med lav molekylvægt (MW < 6000 dalton), polyethylenglykoler (MW 1500-15000 dal-

ton) eller gelatinepartialhydrolysater, f.eks. med diisocyanater tværbundne gelatinepartialhydrolysater (polygeliner, "Haemaccel[®]"), eller uopløselige bærestoffer, såsom Sepharoser, f.eks. CH-Sepharose 4B[®] (Fa. Pharmacia), agaroser, 5 cellulose, hydroxymethacrylater, der alle aktiveres efter kendte fremgangsmåder, især dog dextraner, hepariner og hepariner med lav molekylvægt.

Forholdet mellem hirudin og bærestof kan variere meget i hirudin-derivaterne. Forholdet er afhængigt af typen 10 af bærestof og reaktionsbetingelserne.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til fremstilling af hirudin-derivaterne, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at hirudiner omsættes med et aktivt bærestof ved en temperatur på 0°C til 25°C, fortrinsvis ved 4°C.

15 Hirudin-derivaterne ifølge opfindelsen er værdifulde thrombin-inhibitorer, som især udmærker sig ved en forlænget halveringstid, hvilket igen gør en omfattende anvendelse mulig, f.eks. ved thromboseprofylakse.

Således anvendes hirudinerne og hirudin-derivaterne 20 f.eks. fordelagtigt ved overfladebelægning af hjerteklapper (f.eks. af kunststof), kunstige kar, katetre af biokompatible medicinske redskaber eller af filtre, membraner og materialer, såsom keramik, i de gængse hæmdialyseapparater. Ved bestemmelsen og påvisningen af relevante blodkomponenter 25 forekommer der det problem, at det blod, der skal undersøges, skal forbehandles. Dette kan medføre problemer for sådanne analysers udsagnsværdi. Forsøgsrør, der er belagt med hirudin, åbner hidtil ukendte muligheder for praktikerne.

Endvidere finder hirudiner og hirudin-derivater anvendelse i 30 implantater, der bl.a. også anvendes til den forhalede frigivelse af den aktive forbindelse, f.eks. osmotiske minipumper, biologisk nedbrydelige mikrokapsler, stave og liposompræparater.

Hirudin-derivaterne ifølge opfindelsen viser, at 35 hirudiner lader sig omsætte med højmolekylære bærematerialer, hvorved hirudinaktiviteten overraskende opretholdes. Hirudins

farmakokinetiske forhold ændrer sig fordelagtigt. Injiceres hirudin og dextran-hirudin ved et sammenligningsforsøg i rotter, og måler man ved hjælp af en thrombinhæmningsanalyse plasmakoncentrationen, har man efter 1 time med en ca. 10
5 gange lavere mængde dextran-hirudin en målelig thrombinhæmning. Overraskende er der en yderligere fordel ved forlængelsen af halveringstiden. Den er for dextran-hirudin 6 til 7 timer, medens den for hirudin er 1 til 2 timer (Markwardt et al., Pharmazie 43 (1988) 202).

10 De efterfølgende eksempler, i hvilke der anvendes det i DE patentansøgning nr. 3.805.5406 beskrevne isohirudin ('Leu-Thr-hirudin'), skal illustrere opfindelsen, uden at opfindelsen indskrænkes til disse. Det er velkendt for fagfolk, at alle kendte hirudiner ækvivalent med det anvendte
15 hirudin kan omsættes med et bærestof, også de ovenfor beskrevne hirudiner. Derved kan betingelserne for enkelte reaktioner ændre sig.

Eksempel 1.

20 Fremstilling af hirudin.

Syntesen af hirudin sker f.eks. i gærceller, der sekreterer hirudin ifølge DE patentansøgning nr. P 3.805.540.6 (HOE 88/F 043). Hirudin koncentrerer derefter ved hjælp af HP20-søjlechromatografi (DE patentansøgning
25 nr. P 3.738.541.0 HOE 87/F 337). Efter dialyse og efterfølgende affinitetschromatografi over thrombin-Sepharose® (Walsmann, P.: Pharmazie 36 (1981) 860-861) sker den endelige oprensning via "reversted phase"-HPLC.

Syntesen kan dog også udføres ved hjælp af andre
30 kendte genteknologiske eller peptidkemiske metoder.

Eksempel 2.

Anvendelse af hirudin og efterfølgende thrombin-hæmningsanalyse.

35 Wistar-rotter af hunkøn og hankøn med en kropsvægt på ca. 300 g bedøves med ethylurethan (1,5 g/kg i.p.). Rot-

terne får indgivet 1000 AT-U/kg af et hirudin-derivat eller autentisk 'Leu-Thr-hirudin', der er opløst i fysiologisk kogsaltopløsning, i.v. Til blodudtagelse får dyrene implanteret et kateter i carotis. Til bestemmelse af anti-thrombin-aktiviteten udtages blod fra dyrene, og det behandles med citrat. 0,1 ml af det således behandlede blod blandes med 0,2 ml Tris/HCl-puffer (0,1 mol/l, pH 7,4), og der forinkuberes ved 37°C. Efter tilsætning af 0,1 ml af en thrombinopløsning (10 NIH-U/ml) bestemmes koagulationstiden ved hjælp af et koagulometer efter Schnitger og Gross. Parallelt med forsøget fremstilles en standardkurve med referenseplasma, ud fra hvilken den til enhver tid forekommende plasma-hirudin- eller plasma-hirudin-derivat-koncentration aflæses.

15 Eksempel 3.

Dextran-hirudin.

Koblingen af 'Leu-Thr-hirudin' til dextran (MW 70000 dalton) sker efter den metode, der er beskrevet af J. Parikh et al., Meth. Enzymol 34 (1974) 77. Hertil aktiveres dextranen ved behandling med meta-periodat ved 4°C, hvorefter der dialyseres og lyofiliseres. 2 g aktiveret dextran opløses herefter i 285 ml 0,1 mol/l natriumphosphat-puffer (pH 8,8) ved stuetemperatur, hvorefter opløsningen afkøles til 4°C, og hertil sættes 20 mg hirudin, hvorefter der inkuberes i 14 timer ved 4°C. Herefter skilles 75 ml fra, og der lyofiliseres. Efter at de lavmolekylære puffersalte er fjernet ved hjælp af gelfiltrering ("Sephadex® G-25", 1 cm x 100 cm), lyofiliseres opløsningen påny.

Reaktionen finder mindst sted mellem en af de tre lysiner og det aktiverede dextran.

Til reduktion af den dannede Schiff'ske base sættes 75 mg NaBH₄ til de 75 ml af den inkuberede opløsning, hvorefter der omrøres i 40 minutter ved 4°C, hvorefter opløsningen dialyseres mod vand i 24 timer ved 4°C (membran: Servapor Dialysis Lubing; diameter 10 mm, Fa. Serva Feinbiochemica GmbH Heidelberg). Herefter udføres en gelfiltrering over

Sephadex[®] G-25 og en lyofilisering. Dextran-hirudinen oprenses ved hjælp af thrombin-Sepharose[®]-affinitetschromatografi som i eksempel 1. Bestemmelsen af dextran-hirudinaktiviteten sker ifølge den metode, der er beskrevet af Griesbach et al., (Thromb. Res. 37 (1985) 347-350). Herved måles hæmningen af den thrombin-katalyserede spaltning af Chromozym TH[®]. Baseret på den molære basis svarer den målte aktivitet til den for hirudin. Det således oprensede dextran-hirudin overføres ifølge eksempel 2 til Wistar-rotter i.v. Efter 1 time findes en konstaterbar koncentration i rotternes plasma. Dette kan ved sammenligningsforsøg kun beskrives med en ca. 10 gange højere dosis hirudin. Følger man yderligere plasmaets hirudinkoncentration, finder man en halveringstid for elimineringen af stoffet på 6-7 timer. Dette er en betydelig forlængelse i forhold til hirudiner (1-3 timer). Man ser ingen skadelig påvirkning på forsøgsdyrenes velbefindende.

Eksempel 4.

- 20 Sepharose[®]-hirudin.
8 mg hirudin opløses i 2 ml 0,1 M NaHCO₃ og 0,5 M NaCl ved pH = 8,0. 400 mg aktiveret CH-sepharose 4 B[®] (Pharmacia) opkvædes efter fabrikantens forskrifter. Herefter sættes proteinopløsningen til bærestoffet, og blandingen tillades at henstå i 1,5 timer ved 23°C. Herefter frafiltres der ved sugning, og immobilisatet tillades at henstå til inaktivering af de resterende bindingsgrupper i 1 time i 0,1 M Tris, pH = 8,0. Herefter vaskes bærestoffet efter fabrikantens forskrift.
- 30 Protein-koblingsudbyttet er 5%. Den biologiske aktivitet bestemmes in vitro efter eksempel 2. Sepharose[®]-hirudinen isoleres fra det behandlede plasma, hvorefter det vaskes med en 1-1,5 M NaCl-opløsning, hvorefter det påny anvendes ved hæmningsanalysen. Den målte aktivitet ligger inden for fejlgrænsen for den første måling.
- 35

eller Lys 46 er erstattet med Arg i hirudinen.

9. Hirudin-derivat ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at hirudinen er N-terminalt forlænget, og Lys 26, Lys 35 og Lys 46 er erstattet med andre naturlige aminosyrer.
5

10. Hirudin-derivat ifølge et eller flere af kravene 1-9, k e n d e t e g n e t ved, at hirudinen C-terminalt er forlænget med en naturlig aminosyre.

11. Fremgangsmåde til fremstilling af et hirudin-derivat ifølge et eller flere af kravene 1-10, k e n d e t e g n e t ved, at hirudin omsættes med et aktiveret bærestof ved en temperatur på 0°C til 25°C.
10

12. Anvendelse af hirudin-derivater, der er dannet ud fra hirudin eller et fysiologisk acceptabelt salt deraf og et bærestof, hvor hirudin er kemisk bundet til bærestof-
15 fet, som thrombin-inhibitorer.