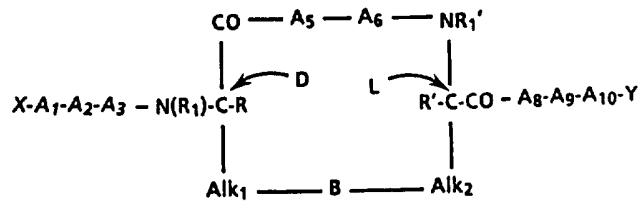




Uppfinningen avser cykliska peptidderivat, vilka är användbara som antikoaguleringsmedel och har formeln



vari X är en aminoterminal rest som valts bland väte, en eller två alkylgrupper, en eller två acylgrupper, karbobensyloxi eller t-butyloxikarbonyl; A<sub>1</sub> är en bindning eller en peptid, vilken innehåller 1-5 aminosyrarester; A<sub>2</sub> är Phe, SubPhe, β-(2- och 3-tienyl)alanin, β-(2- och 3-furanyl)alanin, β-(2-, 3- och 4-pyridyl)alanin, β-(bensotienyl-2- och 3-yl)alanin, β-(1- och 2-naftyl)alanin, Tyr eller Trp; A<sub>3</sub> är Glu eller Asp; A<sub>5</sub> är Ile, Val, Leu, Nle eller Thr; A<sub>6</sub> är Pro, Hyp, 3,4-dehydroPro, tiazolidin-4-karboxylat, Sar, NMePgl eller en aminosyra med D-konfiguration; A<sub>8</sub> är Glu eller Asp; A<sub>9</sub> är en lipofil aminosyra vald bland Tyr, Tyr(SO<sub>3</sub>H), Trp, Phe, Leu, Nle, Ile, Val, His och Pro eller bildar en dipeptid som innehåller åtminstone en av dessa aminosyror, A<sub>10</sub> är en bindning eller ett peptidfragment som innehåller 1-5 aminosyrarester, Y är en karboxiterminal rest vald bland OH, alkoxi, amino, med mono- eller di-alkyl substituerad amino eller bensylamino, R, R', R<sub>1</sub> och R<sub>1</sub>' är var och en väte eller alkyl, B är -S-, -S-S- eller -S-Alk<sub>3</sub>-S-, Alk<sub>1</sub>, Alk<sub>2</sub> och Alk<sub>3</sub> är var och en metylen eller etylen, och "D" och "L" anger att stereokemin hos den indikerade kolatomen motsvarar stereokemin hos D-cystein och L-cystein.

Mentelmä syklisten veren hyytymistä estävien hirudiinin peptidijohdannaisten valmistamiseksi

5 Tämä keksintö koskee uusien syklisten peptidien valmistamiseksi, jotka ovat käyttökelpoisia veren hyytymistä estäviä aineita (antikoagulantteina).

Veren hyytymistä estävät aineet ovat käyttökelpoisia terapeuttisia aineita esimerkiksi akuutin syvän laskimotukoksen, keuhkoveritulpan, raajojen akuuttien valtimotukosten, sydäninfarktin ja sairauden, jossa veri hyytyy useassa elimistön kohdassa yhtäaikaan (DIC), farmakologisessa hoidossa. Antikoagulanttien ennaltaehkäisevän antamisen uskotaan estävän veritulpan uusiutumisen potilailla, joilla on reumaattinen tai verisuonten kalkkiutumisesta johtuva sydänsairaus, ja estävän kirurgian yhteydessä tiettyjä, veren hyytymisestä muodostuvien tulppien aiheuttamia komplikaatioita. Veren hyytymistä estävien aineiden antaminen on myös ollut aiheellista sepelvaltimon ja aivoverisuonien sairauksien hoidossa. Valtimotukos, erityisesti sydänlihasta ja aivoja ravitsevissa valtimoissa, on huomattava kuoleman aiheuttaja.

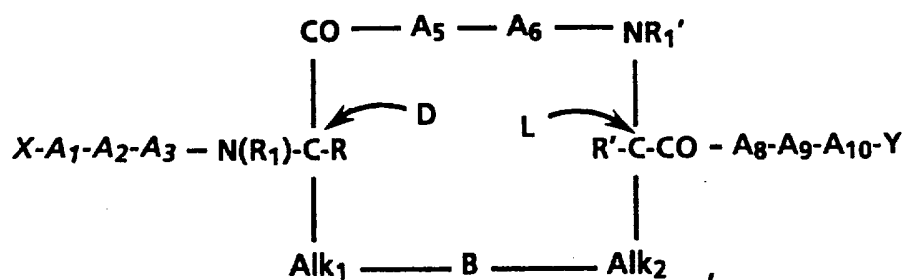
15 Hirudiini on 65 aminohappotähdettä sisältävä polypeptidi, joka on eristetty verijuotikkaiden sylkirauhassista. Se on veren hyytymistä estävä aine ja trombiinin spesifinen estäjä. Verijuotikasuuhteista eristetyn hirudiinin, vaikka se onkin melko tehokasta, kliininen käyttö näyttää epätodennäköiseltä, koska sitä on vähän, se on kallista ja aiheuttaa allergisia reaktioita niin kuin tavallisesti minkä tahansa tämän kokoisen vieraan proteiinin antaminen.

30 Hakijat ovat löytäneet hirudiinistä tarkoin määrätyn alueen, joka saa aikaan, ainakin osaksi, sen veren hyytymistä estävän vaikutuksen. Tämä alue on syntetisoitu kemiallisesti ja eräät sen syklisistä analogeista näyttävät sitoutuvan trombiinin tunnistamiskohtaan, mutta eivät

entsyymättiseen pilkkomiskohtaan, joka on avaruudellisesti erillään. Synteettisten peptidien sitoutuminen kilpailen (kompetitiivisesti) estää fibrinogeenin sitoutumisen trombiinin tunnistamiskohtaan, mikä on edellytys  
 5 fibriinin tuotannolle ja hyytymän muodostumiselle. Tämän keksinnön peptideillä on merkittävä veren hyytymistä estävää vaikutusta, ja niiden epätavallinen kyky sitoutua trombiinin tunnistamiskohtaan ilman, että ne sitoutuvat sen pilkkomiskohtaan, saattaa antaa tieteellisesti mielenkiintoisen ja terapeuttisesti merkittävän avun veren  
 10 hyytymistä estävään hoitoon.

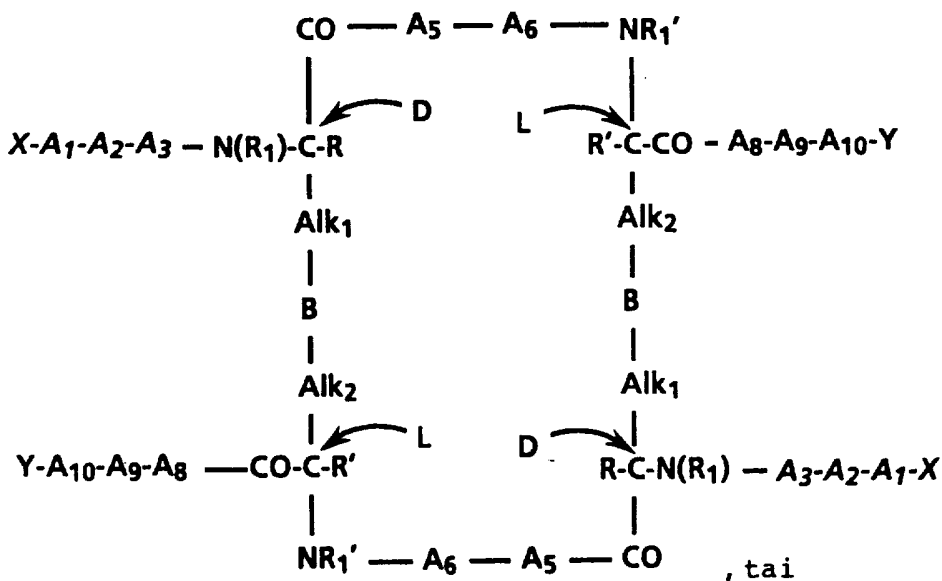
Tämä keksintö koskee hirudiinin johdannaisten valmistamista, joilla on rakennekaavat A, B tai C:

15 A.



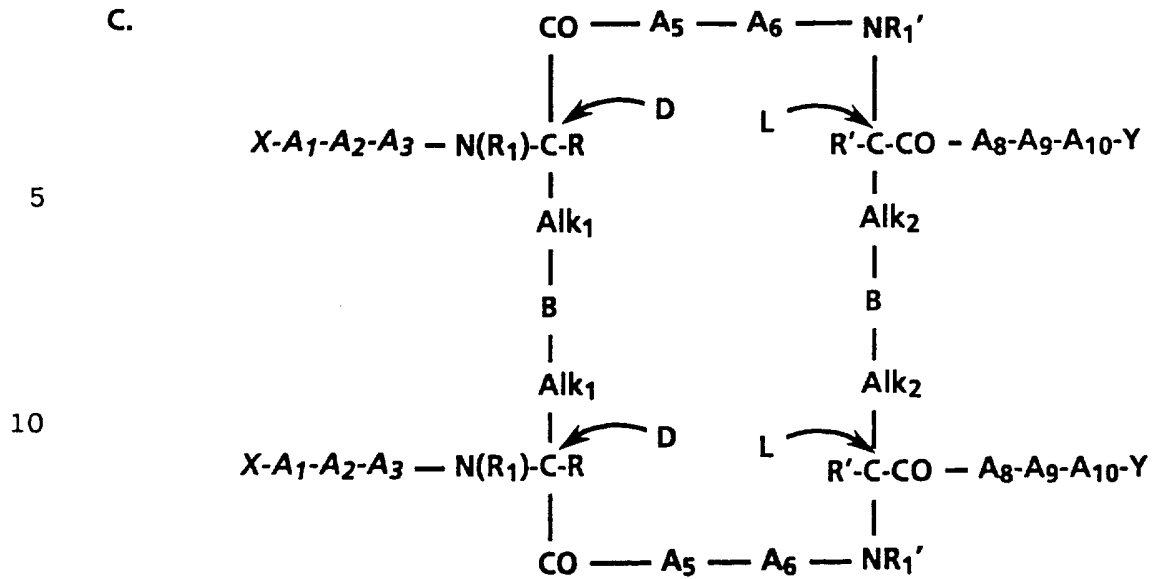
20

25 B.



30

C.



jossa

15 X on aminoterminaalinen tähde, joka valitaan vedystä, 1:stä 6:een hiiliatomia sisältävästä, yhdestä tai kahdesta alkyyli ryhmästä, 2:sta 10:een hiiliatomia sisältävästä, yhdestä tai kahdesta asyyli ryhmästä, karbontsyylioksista tai t-butylioksikarbonyylistä;

20 A<sub>1</sub> on sidos tai Gly-Asp;

A<sub>2</sub> on Phe;

A<sub>3</sub> on Glu;

A<sub>5</sub> on Ile;

A<sub>6</sub> on Pro;

25 A<sub>8</sub> on Glu;

A<sub>9</sub> on Tyr-Leu;

A<sub>10</sub> on sidos tai Gln;

30 Y on karboksiterminaalainen tähde, joka valitaan OH:sta, (C<sub>1-6</sub>)-alkoksista, aminosta, mono- tai di-(C<sub>1-4</sub>)-alkyyllillä substituoidusta aminosta tai bentsyyliaminosta;

R, R', R<sub>1</sub> ja R<sub>1</sub>' valitaan jokainen vedystä tai (C<sub>1-4</sub>)-alkyyli ryhmästä;

B valitaan -S-:stä, -S-S-:stä tai S-Alk<sub>3</sub>-S-:stä;

35 Alk<sub>1</sub>, Alk<sub>2</sub> ja Alk<sub>3</sub> valitaan jokainen (C<sub>1-8</sub>)-metyleeniryhmästä;

ja jossa "D" ja "L" ilmaisevat, että osoitetun hiilen stereokemia vastaa D-kysteiniinin ja L-kysteiniinin stereokemiaa, tässä järjestyksessä.

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomais-  
5 ta, että kaavan A<sub>1</sub> mukainen, sopivasti suojattu amino-  
happo sidotaan aktivoituun hartsikantajaan, myöhemmin  
kaavojen A<sub>2</sub>-A<sub>10</sub> mukaiset muut alfa-aminosuojatut aminoha-  
pot sidotaan kasvavan peptidiketjun, josta on sillä välin  
poistettu sen aminon suojaryhmä, terminaaliseen aminoryh-  
10 mään, ja lopuksi lineaarinen peptidi altistetaan hapetta-  
valle kytkennälle.

Koko tämän patenttiselityksen ajan aminohapoista  
käytetään seuraavia yleisiä lyhenteitä;

Gly - glysiini  
15 Ala - alaniini  
Val - valiini  
Leu - leusiini  
Ile - isoleusiini  
Pro - proliini  
20 Phe - fenyylialaniini  
Trp - tryptofaani  
Met - metioniini  
Ser - seriini  
Thr - treoniini  
25 Cys - kysteiniini  
Tyr - tyrosiini  
Asn - asparagiini  
Gln - glutamiini  
Asp - asparagiinihappo  
30 Glu - glutamiinihappo  
Lys - lysiini  
Arg - arginiini  
His - histidiini  
Nle - norleusiini  
35 Hyp - hydroksiproliini

3,4-dehydroPro - 3,4-dehydroproliini

Tyr(SO<sub>3</sub>H) - tyrosiinisulfaatti

Pgl - fenyyliglysiini

NMePgl - N-metyylifenyyliglysiini

5 Sar - sarkosiini (N-metyyliglysiini)

pSubPhe - para-substitutoitu fenyylialaniini

SubPhe - orto-, meta- tai para- mono- tai disubstituoitu fenyylialaniini

DAla - D-alaniini

10 Ac - asetyyli

Suc - sukkinyyli

pClPhe - para-kloorifenyylialaniini

PNO<sub>2</sub>Phe - para-nitrofenyylialaniini

Pen - penisillamiini (β,β-dimetyylidikysteini)

15 DCys - D-kysteini

Alkyyliiryhmän ja alkoksiryhmän alkyylioson katsotaan käsittävän suorat, haarjoittuneet tai sykliset alkyyliiryhmät, esimerkiksi metyyli, etyyli, propyyli, isopropyyli, butyyli, isobutyyli, tert-butyyli, pentyyli, isopentyyli, sec-pentyyli, syklopentyyli, heksyyli, isohexyyli, sykloheksyyli ja syklopentyyliimetyyli. 2:sta 10:een hiiliatomia sisältävän asyyliiryhmän katsotaan käsittävän suorat, haaroittuneet, sykliset, tyydyttyneet ja tyydyttymättömät asyyliiryhmät, joissa on ryhmää kohti 1 tai 2 karbonyyliosa, esimerkiksi asetyyli, bentsoyyli ja sukkinyyli. Termi "(C<sub>1-8</sub>)-metyleeniryhmä" merkitsee kaksiarvoista ryhmää, joka on saatu avoketjuisesta tai syklistä, tyydyttyneestä tai tyydyttymättömästä alkyyliiryhmästä, jossa on 1:stä 8:aan hiiliatomia, poistamalla käsitteellisesti alkyyliiryhmästä kaksi vetyatomia yhdestä hiiliatomista tai kahdesta vierekkäisestä hiiliatomista. Tämän keksinnön (C<sub>1-8</sub>)-metyleeniryhmiä ovat esimerkiksi metyleeni tai metylideeni (-CH<sub>2</sub>-), etylideeni (CH<sub>3</sub>CH<), 1-metylietylideeni (CH<sub>3</sub>C(CH<sub>3</sub>)<), 1-metyylipropyliideeni tai sec-butylideeni (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<), 2,2-dimetyylipropyli-

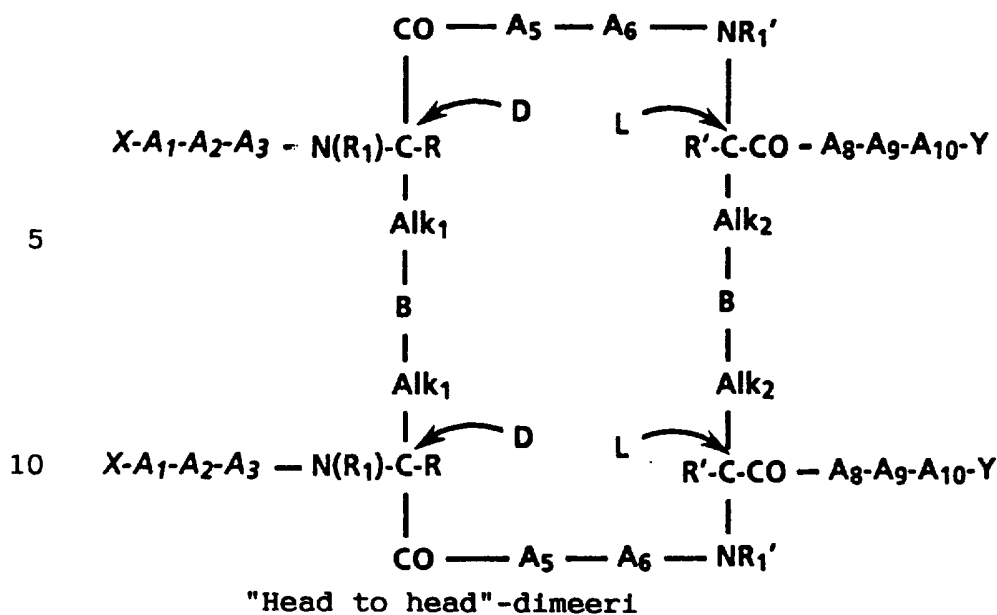
deeni tai neopentylideeni ( $\text{CH}_3\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}<$ ), etyleeni tai dimetyyleeni ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ), metyylietyleeni ( $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$ ), etyylietyleeni ( $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-$ ), etenyleeni tai vinyleeni ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 1,1-etenylideeni ( $\text{CH}_2=\text{C}<$ ), 1,1-sykloheksyli-  
 5 deeni ( $\text{C}_6\text{H}_{10}<$ ) ja 1,2-syklopentylideeni ( $\text{C}_5\text{H}_8<$ ). Halogeeni-ryhmä on fluori-, kloori-, bromi- tai jodiryhmä.

Tässä käytetty termi "mikä tahansa aminohappo" käsittää luonnossa esiintyvät aminohapot, samoin kuin muitakin "ei-proteiini"- $\alpha$ -aminohapot, joita peptidikemian  
 10 asiantuntijat tavallisesti käyttävät valmistaessaan luonnossa esiintyvien peptidien synteettisiä analogeja. Luonnossa esiintyviä aminohappoja ovat glysiini, alaniini, valiini, leusiini, isoleusiini, seriini, metioniini, treoniini, fenyylialaniini, tyrosiini, tryptofaani, kysteini,  
 15 proliini, histidiini, asparagiinihappo, asparagiini, glutamiinihappo, glutamiini, arginiini, ornitiini ja lysini. "Ei-proteiini"- $\alpha$ -aminohappoja ovat esimerkiksi norleusiini, norvaliini, alloisoleusiini, homoarginiini, tiaproliini, dehydroproliini, hydroksiproliini  
 20 (Hyp), homoseriini, sykloheksyyli-glysiini (Chg),  $\alpha$ -aminonvoihappo (Aba), sykloheksyyli-alaniini (Cha), aminofenyyli-voihappo (Pba), fenyylialaniinit, jotka on mono- tai disubstituoitu fenyylioson orto-, meta- tai para-ase-  
 25 millä tai metyleenidioksi-ryhmällä,  $\beta$ -(2- ja 3-tienyyli)-alaniini,  $\beta$ -(2 ja 3-furanyyli)alaniini,  $\beta$ -(2-, 3- ja 4-pyridyyli)alaniini,  $\beta$ -bentsoetienyl-2- ja 3-yyli)alaniini,  $\beta$ -(1- ja 2-naftyyli)alaniini, seriinin, treoninin tai tyrosiinin O-alkyloidut johdannaiset, S-alkyloitu  
 30 kysteini, tyrosiinin O-sulfaattiesteri, 3,5-dijodityrosiini ja luonnossa esiintyvien aminohappojen D-isomeerit.

Termi "lipofiilinen aminohappo" sisältää Tyr:n, Tyr( $\text{SO}_3\text{H}$ ):N Phe:n, Leu:n, Nle:n, Ile:n, Val:n, His:n ja Pro:n.







15 joissa substituentit ovat samoja kuin edellä on määritelty rakenteelle 1. Koko tämän selityksen ajan viittaus peptidijohdannaisiin sisältää dimeerit ja seokset ellei lauseyhteys edellytä toisin. Vaikka syklistointivaiheesta saatavat monomeerin ja dimeerin seokset voidaan erottaa helposti alan asiantuntijoille tunnetuin

20 keinoihin, tämän keksinnön mukaisissa veritulppia ehkäisevissä koostumuksissa voidaan käyttää seoksia niitä erottamatta.

25 Kaavan 1 mukaiset polypeptidit voivat muodostaa farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja minkä tahansa myrkyttömän, orgaanisen tai epäorgaanisen hapon kanssa. Valaisevia esimerkkejä epäorgaanisista hapoista, jotka muodostavat sopivia suoloja, ovat vetykloridi-, vetybromidi-, rikki- ja fosforihappo ja happamat metallisuolat, kuten esimerkiksi natriummonovetyortofosfaatti

30 ja kaliumvetysulfaatti. Sopivia suoloja muodostaviin orgaanisiin happoihin kuuluvat esimerkiksi mono-, di- ja trikarboksyylihapot. Valaisevia esimerkkejä tällaisista hapoista ovat etikka-, hydroksietikka-, maito-,

palorypäle-, maloni-, meripihka-, glutaari-, fumaari-,  
 omena-, viini-, sitruuna-, askorbiini-, maleiini-, hyd-  
 roksimaleiini-, bentsoe-, hydroksibentsoe-, fenyyl-  
 etikkakaneli-, salisyyli-, 2-fenoksibentsoe- ja sulfo-  
 5 nihapot, kuten esimerkiksi metaanisulfonihappo ja 2-  
 hydroksietaanisulfonihappo. Aminohappo-osan terminaali-  
 nen karboksiryhmän suoloihin kuuluvat myrkyttömät kar-  
 boksyylihapposuolat, jotka ovat muodostuneet minkä ta-  
 hansa sopivan epäorgaanisen tai orgaanisen emäksen  
 10 kanssa. Näihin suoloihin kuuluvat kuvaavasti alkalime-  
 tallien, esimerkiksi natriumin ja kaliumin suolat; maa-  
 alkalimetallien, kuten kalsiumin ja magnesiumin suolat;  
 ryhmän IIIA kevytmetallien suolat aluminium mukaan lu-  
 kien; ja orgaanisten primaaristen, sekundaaristen ja  
 15 tertiääristen amiinien suolat, esimerkiksi trialkyyli-  
 amiinien suolat, trietyyliamiinin, prokaiinin, dibent-  
 syyliamiinin, 1-etenamiinin, N,N'-dibentsyylietyleni-  
 diamiinin, dihydroabietyyliamiinin, N-(alempi)alkyyli-  
 piperidiinin ja minkä tahansa sopivan amiinin suolat  
 20 mukaan lukien.

Kuten kemiallisten yhdisteiden minkä tahansa  
 yleisen ryhmän kohdalla tietyt ryhmät ovat edullisia.  
 Hakijat pitävät edullisina niitä kaavan 1 mukaisia pep-  
 tidijohdannaisia, joissa

25 X on vety, asetyyli tai sukkinyyli.

Edullisia ovat myös ne kaavan 1 mukaiset yhdis-  
 teet, joissa

A<sub>1</sub> on -Gly-Asp-,

Y, OH tai NH<sub>2</sub>; ja

30 B on -S-S-.

Tämän keksinnön mukaiset peptidit voidaan valmistaa eri menetelmillä, jotka alan asiantuntijat ilman muuta tuntevat. Tällaisiin menetelmiin kuuluvat kiinteän faasin jaksolliset ja "block" synteetit, geenikloonaukset ja näiden tekniikkojen yhdistelmät. Kiinteän faasin jaksollinen menetelmä voidaan suorittaa vakiintuneita automatisoituja menetelmiä, kuten automatisoitua peptidin syntetisointilaitetta käyttäen. Tässä menetelmässä  $\alpha$ -aminosuojattu aminohappo sidotaan hartsikantajaan. Käytettävä hartsikantaja voi olla mitä tahansa sopivaa hartsiä, jota käytetään tavanomaisesti alan piirissä polypeptidien kiinteän faasin valmistamisessa, edullisesti se on polystyreeniä, joka on ristiinsidottu 0,5:stä noin 3:een prosentilla divinyylibentseeniä, ja se on joko kloorimetyloitu tai hydroksimetyloitu, jotta on saatu kohtia, jotka muodostavat esterin alussa tuotetun  $\alpha$ -aminosuojatun aminohapon kanssa.

Esimerkin hydroksimetyylihartseista esittävät Bodanszky et al., Chem. Ind (London) 38 (1966) 1597-98. Kloorimetyloitua hartsiä on kaupallisesti saatavilla Bio Rad Laboratories'ista, Richmond, Kalifornia, ja tällaisen hartsin valmistamisen kuvaavat Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (Freeman & Co., San Francisco 1969), luku 1, s. 1-6. Suojatut aminohapot voidaan sitoa hartsiin Gisin'in, Helv. Chem. Acta, 56 (1973) 1476, menetelmällä. Monia hartsiin sidottuja suojattuja aminohappoja on kaupallisesti saatavilla. Esimerkiksi tämän keksinnön mukaisen polypeptidin, jossa karboksiterminaalinen pää on Thr-tähde, valmistamisessa

voidaan käyttää tert-butylioksidikarbonyylillä (Boc) suojattua Thr:ä, joka on sidottu bentsyloituun, hydroksimetyloituun fenyyliasetamidometyyli (PAM)-hartsiin, ja sitä kaupallisesti saatavilla.

5            $\alpha$ -aminosuojatun aminohapon hartsiin kytkemisen jälkeen suojaryhmä poistetaan mitä tahansa sopivaa menetelmää käyttäen, esimerkiksi käyttämällä trifluorietikkahappoa metyleenikloridissa, trifluorietikkahappoa yksinään tai HCl:a dioksaanissa. Suojaus poistetaan lämpötilassa, joka on 0 °C:n ja huoneen lämpötilan välillä. Erityisen  $\alpha$ -aminon suojaryhmien poistamiseen voidaan käyttää muita lohkaisevia perusreagenssejä ja olosuhteita.  $\alpha$ -aminon suojaryhmän poistamisen jälkeen muut aminosuojatut aminohapot kytketään asteittain halutussa järjestyksessä. Vaihtoehtoisesti monet aminohapporyhmät voidaan kytkeä liuosmenetelmällä ennen kytkemistä hartsiin, joka pitää yllä aminohappojärjestyksen.

$\alpha$ -aminon suojaryhmä, jota käytetään jokaisessa polypeptidijonoon tuodussa aminohapossa, voi olla mikä tahansa tällainen alan piirissä tunnettu suojaryhmä. Mahdollisena pidettäviä suojaryhmiä  $\alpha$ -aminon suojaryhmäluokista ovat (1) asyylytyypiset suojaryhmät, kuten esimerkiksi: formylyli, trifluoriasetyyli, ftalyyli, tolueenisulfonyyli (tosyyli), bentseenisulfonyyli, nitrofenyyლისulfonyyli, trityylisulfonyyli, o-nitrofenoksisetyyli ja  $\alpha$ -klooributyryyli; (2) aromaattiset uretaanityypiset suojaryhmät, kuten esimerkiksi bentsyylioksidikarbonyyli ja substituoitu bentsyylioksidikarbonyyli, kuten p-klooribentsyylioksidikarbonyyli, p-nitrobentsyylioksidikarbonyyli, p-bromibentsyylioksidikarbonyyli, p-metoksibentsyylioksidikarbonyyli, 1-(p-bifenyyli)-1-metyylietoksidikarbonyyli,  $\alpha,\alpha$ -dimetyyli-3,5-dimetoksibentsyylioksidikarbonyyli ja bentshydryylioksidikarbonyyli; (3) alifaattiset uretaanisuojaryhmät, kuten esimerkiksi tert-butylioksidikarbonyyli (Boc), di-isopropyylimetoksidikarbonyyli, isopropylioksidikarbonyyli, etoksidikarbonyyli

ja allyylioksikarbonyyli; (4) sykloalkyyliuretaanityyp-  
piset suojaryhmät, kuten esimerkiksi syklopentyylioksi-  
karbonyyli, adamantyylioksikarbonyyli ja sykloheksyyli-  
oksikarbonyyli; (5) tioureaanityyppiset suojaryhmät,  
5 kuten esimerkiksi fenyyliitiokarbonyyli; (6) alkyylityyp-  
piset suojaryhmät, kuten esimerkiksi trifenyylimetyyli  
(trityyli) ja bentsyyli; ja (7) trialkyylisilaaniryhmät,  
kuten esimerkiksi trimetyylisilaani. Edullinen  $\alpha$ -aminon  
suojaryhmä on tert-butyylioksikarbonyyli.

10 Sopivan kytkentäreagenssin valitseminen on alan  
asiantuntemuksen piirissä. E erityisen sopiva kytkentä-  
reagenssi silloin, kun lisättävä aminohappo on Gln,  
Asn tai Arg, on N,N'-di-isopropyylikarbodi-imidi ja  
1-hydroksibentsotriatsoli. Näiden reagenssien käytöllä  
15 estetään nitriilin ja laktaamin muodostuminen. Muita  
kytkentäreagesseja ovat (1) karbodi-imidit (esim. N,N'-  
disykloheksyylikarbodi-imidi ja N-etyyli-N'-( $\gamma$ -dimetyyli-  
aminopropyylikarbodi-imidi); (2) syanamidit (esim. N,N-  
dibentsyyllisyanamidi); (3) keteniimiinit; (4) isoksat-  
20 soliumsuolat (esim. N-etyyli-5-fenyyli-isoksatsolium-  
3'-sulfonaatti); (5) aromaattisluontoiset monosykliset  
typpeä sisältävät heterosykliset amidit, joiden ren-  
kaassa on yhdestä neljään typpiatomia, kuten esimerkik-  
si imidatsolidit, pyratsolidit ja 1,2,4-triatsolidit.  
25 Erityisiin käyttökelpoisiin heterosyklisiin amideihin  
kuuluvat N,N'-karbonyyli-imidatsoli ja N,N-karbo-  
nyyli-di-1,2,4-triatsoli; (6) alkoksiloitu asetyleeni  
(esim. etoksiasetyleeni); (7) reagenssit, jotka muodos-  
tavat seka-anhydridin aminohapon karboksyyliosan kans-  
30 sa (esim. etyyliklooriformaatti ja isobutylikloori-  
formaatti) tai kytkettävän aminohapon symmetrinen  
anhydridi (esim. Boc-Ala-O-Ala-Boc) ja (8) typpeä si-  
sältävät heterosykliset yhdisteet, joissa on hydroksi-  
ryhmä yhdessä rengastypessä (esim. N-hydroksiftaali-  
35 imidi, N-hydroksisukkinimidi ja 1-hydroksibentsotriat-  
soli). Kapoor, J. Pharm. Sci. 59 (1970) s. 1-27, esit-

tää muita aktivointireagenssejä ja niiden käyttöä peptidikytkennässä. Hakijoista kytkentäreagenssina on edullista käyttää symmetristä anhydridiä kaikkiin muihin aminohappoihin paitsi Arg:iin, Asn:iin ja Gln:iin.

5 Jokaista suojattua aminohappoa tai aminohappojonoa pannaan kiinteän faasin reaktoriin noin nelinkertainen ylimäärä, ja kytkentä suoritetaan väliaineessa, jossa on dimetyyliformamidia ja metyleenikloridia (1:1) tai pelkästään dimetyyliformamidia tai edullisesti pel-  
10 kästään metyleenikloridia. Tapauksissa, joissa kytketyminen on epätäydellistä, kytkentämenettely toistetaan ennen  $\alpha$ -aminon suojaryhmän poistamista, ennen seuraavan aminohapon kytkemistä kiinteän faasin reaktorissa. Kytketyimisreaktion onnistumista tarkkaillaan synteessin  
15 jokaisessa vaiheessa ninhydriinireaktiolla kuten E. Kaiser et al., Analyt. Biochem. 34 (1970) 595, ovat esittäneet.

Sen jälkeen kun haluttu aminohappojärjestys on saatu, peptidi poistetaan hartsista. Se voidaan suorittaa hydrolyysillä, kuten esimerkiksi käsittelemällä  
20 hartsia, johon polypeptidi on sidottu, liuoksella, jossa on dimetyylisulfidia, p-kresolia ja tiokresolia laimeassa vetyfluoridihapon vesiliuoksessa.

Niin kuin kiinteän faasin peptidisynteesin alalla tiedetään, monissa aminohapoissa on funktionaalisia ryhmiä, jotka täytyy suojata ketjun valmistuksen aikana. Sopivan suojaryhmän käyttäminen ja valitseminen kuuluu alan asiantuntijoiden taidon piiriin ja riippuu suojattavasta aminohaposta ja peptidissä olevista muis-  
30 ta suojatuista aminohappotähteistä. Tällaisen sivuketjua suojaavan ryhmän valitseminen on tärkeää siksi, koska ryhmän täytyy olla sellainen, että se ei poistu lohkaisemalla  $\alpha$ -amino-osan suojaryhmän lohkaisun aikana. Lysiinin sivuketjun sopivia suojaryhmiä ovat esimerkik-  
35 si bentsyylioksikarbonyyli ja substituoitu bentsyylioksikarbonyyli, mainittu substituentti valitaan halo-

geenista (esim. kloori, bromi, fluori) ja nitrosta (esim. 2-klooribentsyylioksidikarbonyyli, p-nitrobentsyylioksidikarbonyyli, 3,4-diklooribentsyylioksidikarbonyyli), tosyyli, t-amyylioksidikarbonyyli, t-butylioksidikarbonyyli ja di-isopropyylimetoksidikarbonyyli. Treoniinin ja seriinin alkoholinen hydroksyyli-ryhmä voidaan suojata asetyyli-, bentsoyyli-, tert-butyli-, trityyli-, bentsoyyli-, 2,6-diklooribentsyyli- tai bentsoyylioksidikarbonyyli-ryhmällä. Bentsyyli on edullinen suojaryhmä.

10 Nämä ryhmät voidaan poistaa alan piirissä tunnetuin menetelmin. Suojaryhmä poistetaan tyypillisesti sen jälkeen, kun peptidiketjun synteesi on valmis, mutta suojaryhmät voidaan poistaa minä muuna sopivana ajankoh- tana tahansa.

15 Syklisoidut peptidit valmsitetaan tavallisesti sopivasta lineaarisesta johdannaisesta joko ennen lineaarisen peptidin poistamista kiinteästä kantajasta tai sen jälkeen. Rakenteen 1 mukaiset yhdisteet, joissa B on -S-S- -ryhmä, valmistetaan vastaavista vapaan sulfhydryylin sisältävistä lineaarisista peptideistä tunnetuilla hapettavilla kytkentämenetelmillä, esimerkiksi hapettamalla lineaarinen peptidi kaliumferrisyaniidilla, kuvattu esimerkiksi teoksessa Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (Freeman & Co., San Fransisco 20 1969), luku 1, s. 95. Rakenteen 1 mukaiset yhdisteet, joissa B on -S-Alk<sub>3</sub>-S- -ryhmä ja Alk<sub>3</sub> on (C<sub>1-8</sub>)-etyleeniryhmä, voidaan valmistaa vapaan sulfhydryylin sisältävistä lineaarisista peptideistä antamalla niiden reagoita sopivan avoketuisen tai syklisen, tyydyttyneen tai tyydyttymättömän alkyylin 1,2-dibromijohdannaisen 30 kanssa vastaavalla tavalla kuin H.I. Mosberg ja J. R. Omnaas, J. Amer. Chem. Soc, 107 (1985) 2986-2987, ovat esittäneet. Rakenteen 1 mukaiset yhdisteet, joissa B on -S-Alk<sub>3</sub>-S- -ryhmä ja Alk<sub>3</sub> on (C<sub>1-8</sub>)-metyleeni- 35 ryhmä, valmsitetaan antamalla vapaan sulfhydryylin sisältävän lineaarisen peptidin reagoita sopivan avo-



ketjuisen tai syklisen, tyydyttyneen tai tyydyttymättömän alkyyliketoinin tai -aldehydin kanssa vastaavalla tavalla kuin julkaisussa J. Amer. Chem. Soc. 76 (1954) 1945 on esitetty. Niiden rakenteen 1 mukaisten yhdisteiden, 5 joissa B on -S- -ryhmä, valmistaminen voidaan toteuttaa tavalla, joka on esitetty julkaisussa K. Jost, Collect. Czech. Chem. Commun. 36 (1971) 218 ja US-patentissa nro 4 161 521.

Tämän keksinnön peptidijohdannaisen hyytymistä 10 estävä annos on päivässä 0,2 mg:sta 250 mg:aan potilaan kehonpainokiloa kohti riippuen potilaasta, veritulppaan liittyvän hoidettavan tilan vaikeudesta ja valitusta peptidijohdannaisesta. Tietylle potilaalle sopiva annos voidaan määrittää helposti. Päivittäiset annokset, joita 15 on edullisesti 1:stä 4:ään, annetaan annoksina, joissa on tyypillisesti 5 mg:sta 100 mg:aan vaikuttavaa yhdistettä.

Veren hyytymistä estävä hoito on aiheellista erilaisten veritulppaan liittyvien tilojen, erityisesti se- 20 pelvaltimon ja aivoverisuonten sairauksien hoidossa ja ennaltaehkäisyssä. Alan asiantuntijat ovat ilman muuta selvillä niistä olosuhteista, jolloin hyytymistä estävä hoito on tarpeen. Tässä käytetyn termin "potilas" katsotaan tarkoittavan nisäkkäitä kuten esimerkiksi 25 kädellisiä, ihmiset, lampaat, hevoset, nautakarja, siat, koirat, kissat, rotat ja hiiret mukaan lukien.

Vaikka jotkut peptidijohdannaisista saattavat säilyä kuljettuaan suoliston läpi oraalisen antamisen jälkeen, hakijat pitävät muuta kuin oraalista antamista edullisena, esimerkiksi subkutaanista, intrave- 30 noosia, intramuskulaarista tai intraperitoneaalista antamista; pitkävaikutteisena ruiskeena antamista; implantoitavana valmisteena antamista; tai limakalvoille asettamista, kuten esimerkiksi nenän, kurkun ja 35 keuhkoputkien limakalvolle, esimerkiksi aerosolina, joka voi sisältää tämän keksinnön peptidijohdannaista suihkeen tai kuivan jauheen muodossa.

Parenteraalisessa antamisessa yhdisteet voidaan antaa ruiskutettavina annoksina, joissa yhdiste on liuoksena tai suspensiona fysiologisesti hyväksyttävässä laimentimessa farmaseuttisen kantaja-aineen kanssa, joka  
5 voi olla steriili neste, kuten vesi ja öljyt, yhdessä lisätyn pinta-aktiivisen aineen ja muiden farmaseuttisesti hyväksyttävien apuaineiden kanssa tai ilman niitä. Valaisevia esimerkkejä öljyistä, joita voidaan käyttää näissä valmisteissa, ovat maaöljy, eläinöljyt, kasvis-  
10 öljyt tai synteettistä alkuperää olevat öljyt, esimerkiksi mapähkinäöljy, soijapapuöljy ja mineraaliöljy. Yleensä vesi, suolaliuos, glukoosin vesiliuos ja vastaavanlaiset sokeriliuokset, etanoli ja glykolit kuten propyleeniglykoli tai polyetyleeniglykoli ovat edullisia  
15 nestemäisiä kantaja-aineita, erityisesti injektio-  
liuoksiin.

Yhdisteet voidaan antaa pitkävaikutteisena ruiskeena tai implantoitavana valmisteena, joka voidaan  
20 formuloida niin, että vaikuttava aineosa vapautuu siitä pitkitetysti. Vaikuttava aineosa voidaan puristaa pille-  
reiksi tai pieniksi sylintereiksi ja implantoida ihon alle tai lihakseen pitkävaikutteisena ruiskeena tai  
implantaattina. Implantaateissa voidaan käyttää tehotomia  
25 aineita kuten esimerkiksi biologisesti hajoavia polymeerejä tai synteettisiä silikoneja, esimerkiksi Silastic-silikonikumia, jota valmistaa Dow-Corning Corporation.

#### Esimerkit

30 Tätä keksintöä havainnollistetaan seuraavilla  
esimerkeillä.

Esimerkki 1

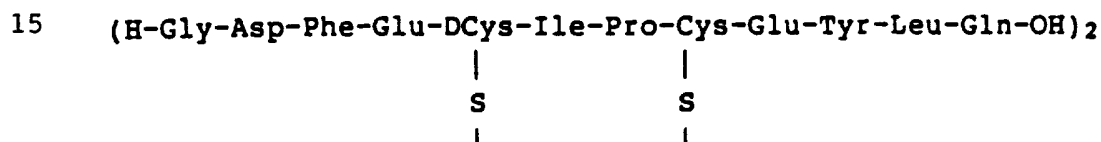
H-Gly-Asp-Phe-Glu-DCys-Ile-Pro-Cys-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH:n valmistaminen

- 5           Peptidi syntetisoitiin kiinteän faasin menetelmällä käyttäen 0,6 mmol/g Boc-Gln-PAM -hartsia 0,1 mmol. Kaksinkertaiset kytkennät symmetrisellä anhydridillä suoritettiin 2,0 mmol:lla N $\alpha$ -Boc-aminohappoa (Peptides International) paitsi Boc-Gln:n tapauksessa, jolloin
- 10           kytkettiin DCC/HOBT-menetelmällä. Käytetty sivuketjun suojaus oli: Asp(Chx), Cys(pMeBzl), Glu(Bzl), Tyr(2-BrZ). Kun synteesi oli valmis, N $\alpha$ -Boc-suojaus poistettiin 50 %:isella trifluorietikkahapolla metyleenikloridissa. Hartsia pestiin kolme kertaa metyleenikloridilla, neut-
- 15           raloitiin pesemällä kolme kertaa 10 %:isella di-isopropyplietyyliamiinilla metyleenikloridissa, pestiin kolme kertaa metyleenikloridilla, asetyloitiin N-asetyyliimidatsolilla metyleenikloridissa, pestiin kolme kertaa metyleenikloridilla ja kuivattiin vakuuissa. Peptidin
- 20           suojaus poistettiin ja se lohkaistiin hartsista vedellä ja pienellä määrällä 30 %:ista etikkahapon vesiliuosta. Uute laimennettiin vedellä tilavuudeltaan 2 l:ksi ja pH säädettiin 8,5:ksi ammoniumhydroksidilla. Liuokseen lisättiin kaliumferrisyanidia (0,01 N) kunnes keltainen
- 25           väri pysyi. Liuosta sekoitettiin 30 minuuttia, sitten pH säädettiin etikkahapolla 4:n ja 5:n välille. Sitten seosta sekoitettiin 2 tuntia Bio-Rad- AG3-X4A ioninvaihtohartsin kanssa. Seos suodatettiin ja suodos kylmäkuivattiin.
- 30           Peptidi puhdistettiin suolanpoistolla 92 x 2,9 cm:n Sephadex G-15-kolonissa 5 % vesipitoisessa etikkahapossa ja kylmäkuivattiin. Preparatiivinen HPLC suoritettiin C<sup>18</sup> Vydac 218TP1010 (250 x 10 mm) -kolonnilla ajonesteellä, jossa oli 24 % asetonitriiliä
- 35           0,1 %:ssa vesipitoisessa trifluorietikkahapossa, virtausnopeudella 5 ml/min. Pääpiikki kerättiin ja kylmäkuivat-

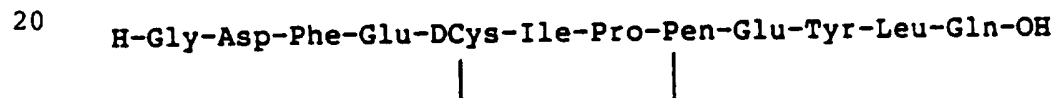
tiin, jolloin saatiin 24 mg haluttua tuotetta, ja di-  
meeri eristettiin myöhemmin eluoituvasta piikistä  
(14,2 mg). Tasa-aineisuus määritettiin HPLC:llä ja  
TLC:llä. HPLC Vydac 218TP54 (250 x 4,6 mm) C<sup>18</sup> -kolonni,  
5 2 ml/min, t<sub>0</sub> = 1,8 min: eluotumisaika 25-50 %:isen  
asetonitriilin 0,1 %:isessä trifluorietikkahapossa  
lineaarisella gradientilla 1 %/min (HPLC) on 9,3 min.  
FAB-MS: (M + H) = 1414 ± 1 mp (laskettu 1413). Amino-  
happoanalyysi (6 N HCl -hydrolyysi; 24 tuntia 106 °C:ssa)  
10 esitetään taulukossa 1.  
Peptidipitoisuus 62 paino-%.

Seuraavien esimerkkien 2-4 mukaiset peptidit  
valmistettiin samanlaisella tavalla.

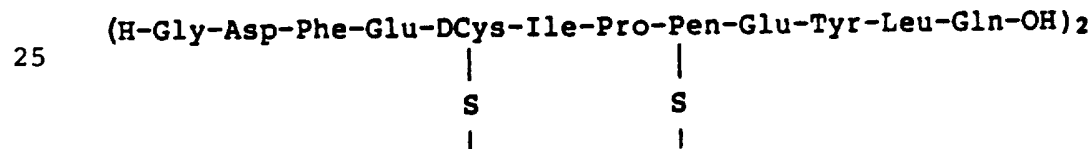
Esimerkki 2



Esimerkki 3



Esimerkki 4



Esimerkkien 1-4 mukaisilla peptideillä on seu-  
raavat ominaisuudet:

Esim. nro	Aminohappoanalyysi (6N HCl-hydrolyysi; 24 tuntia 106°C:ssa)							
	Asx	Glx	Pro	Gly	Ile*	Leu	Tyr	Phe
1	1.03(1)	3.08(3)	0.91(1)	1.01(1)	0.72(1)	0.98(1)	0.95(1)	1.04(1)
2	1.00(1)	3.10(3)	0.97(1)	0.99(1)	0.91(1)	1.01(1)	0.88(1)	0.94(1)
3	1.00(1)	3.00(3)	0.83(1)	1.01(1)	0.68(1)	1.01(1)	1.00(1)	0.99(1)
4	1.01(1)	2.94(3)	0.98(1)	1.02(1)	0.85(1)	1.02(1)	1.02(1)	1.01(1)

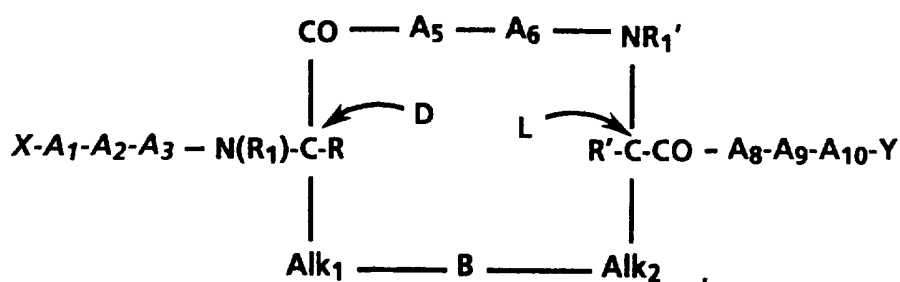
\* Osaa, joka muuttui allo-Ile:ksi hydrolyysin aikana, ei määritetty kvantitatiivisesti.

Fysikaaliset ominaisuudet		
Esim. nro	HPLC t <sub>r</sub> (min)	FAB-MS (M + H)
1	9.3	1414
2	12.8	2826
3	9.2	1445
4	13.6	2883

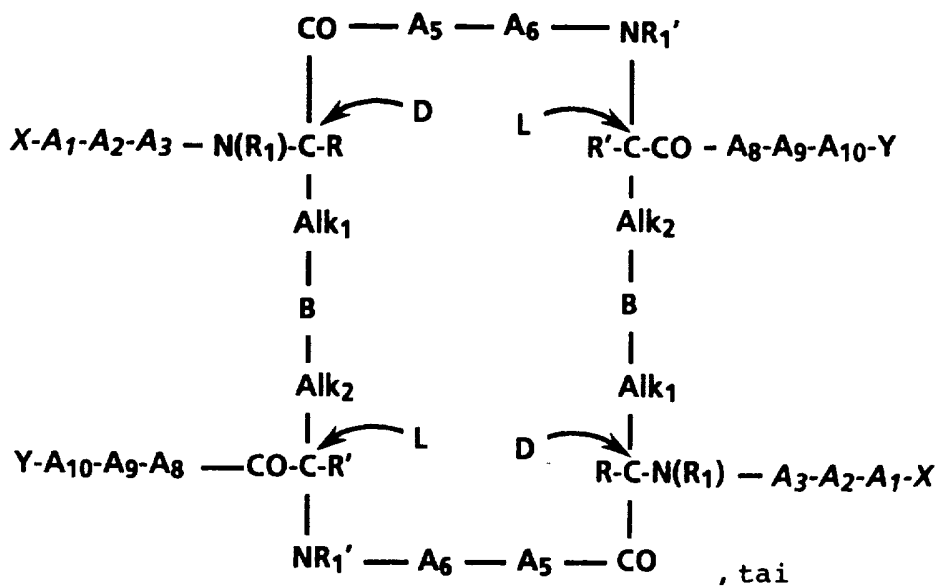
## Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisesti käyttökelpoisen hiru-  
diinipeptidijohdannaisen ja sen dimeerin valmistamiseksi,  
jolla on kaava

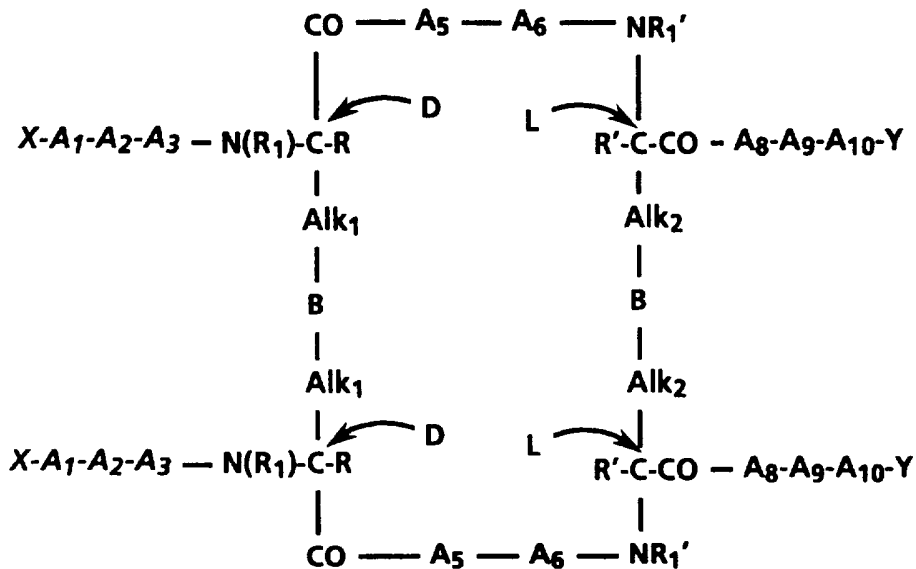
A.



B.



C.



jossa

X on aminoterminaalinen tähde, joka valitaan vedystä, 1:stä 6:een hiiliatomia sisältävästä, yhdestä tai kahdesta alkyyliryhmästä, 2:sta 10:een hiiliatomia sisältävästä, yhdestä tai kahdesta asyyliiryhmästä, karbobent-

5 syylioksista tai t-butyylioksikarbonyylistä;

A<sub>1</sub> on sidos tai Gly-Asp;

A<sub>2</sub> on Phe;

A<sub>3</sub> on Glu;

10 A<sub>5</sub> on Ile;

A<sub>6</sub> on Pro;

A<sub>8</sub> on Glu;

A<sub>9</sub> on Tyr-Leu;

A<sub>10</sub> on sidos tai Gln;

15 Y on karboksiterminaalainen tähde, joka valitaan OH:sta, (C<sub>1-6</sub>)-alkoksista, aminosta, mono- tai di-(C<sub>1-4</sub>)-alkyyllillä substituoidusta aminosta tai bentsyyliaminosta;

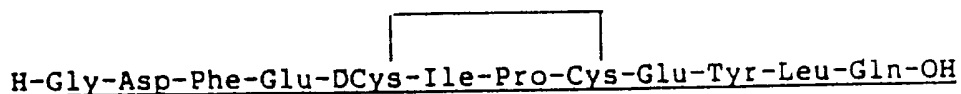
20 R, R', R<sub>1</sub> ja R<sub>1</sub>' valitaan jokainen vedystä tai (C<sub>1-4</sub>)-alkyyliiryhmästä;

B valitaan -S-:stä, -S-S-:stä tai S-Alk<sub>3</sub>-S-:stä;

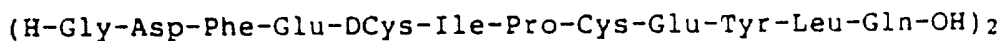
Alk<sub>1</sub>, Alk<sub>2</sub> ja Alk<sub>3</sub> valitaan jokainen (C<sub>1-3</sub>)-metyleeniryhmästä;

25 ja jossa "D" ja "L" ilmaisevat, että osoitetun hiilen stereokemia vastaa D-kysteiinin ja L-kysteiinin stereokemiaa, tässä järjestyksessä, t u n n e t t u siitä, että kaavan A<sub>1</sub> mukainen, sopivasti suojattu aminohappo sidotaan aktivoituun hartsikantajaan, myöhemmin kaavojen A<sub>2</sub>-A<sub>10</sub> mukaiset muut alfa-aminosuojatut aminohapot sidotaan kasvavan peptidiketjun, josta on sillä välin poistettu sen aminon suojaryhmä, terminaaliseen aminoryhmään, ja lopuksi lineaarinen peptidi altistetaan hapettavalle kytkennälle.

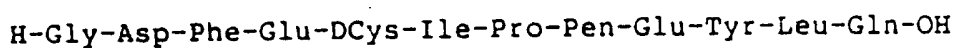
35 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan



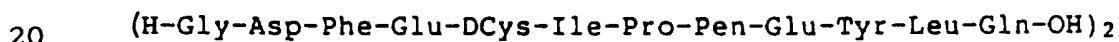
5            3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,  
 t u n n e t t u siitä, että valmistetaan



10            4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,  
 t u n n e t t u siitä, että valmistetaan



15            5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,  
 t u n n e t t u siitä, että valmistetaan

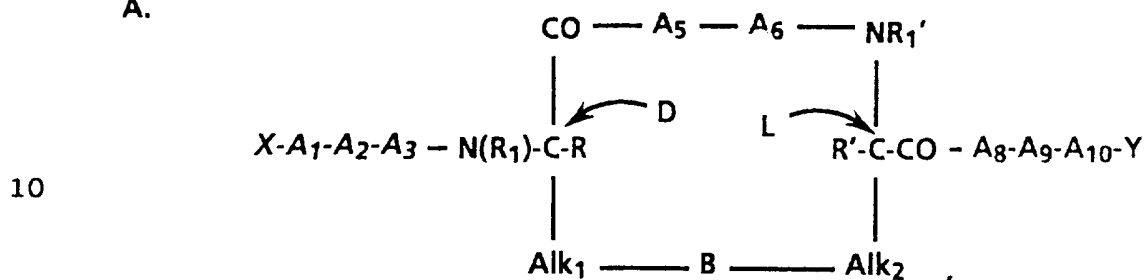




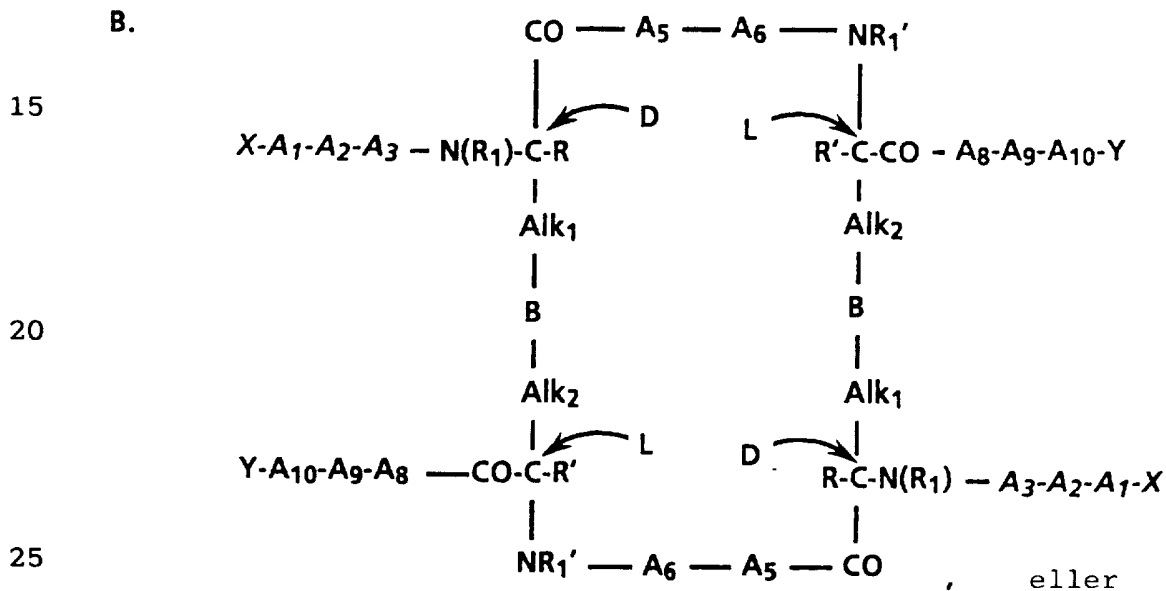
## Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett terapeutiskt användbart hirudinpeptidderivat och dess dimer med formeln

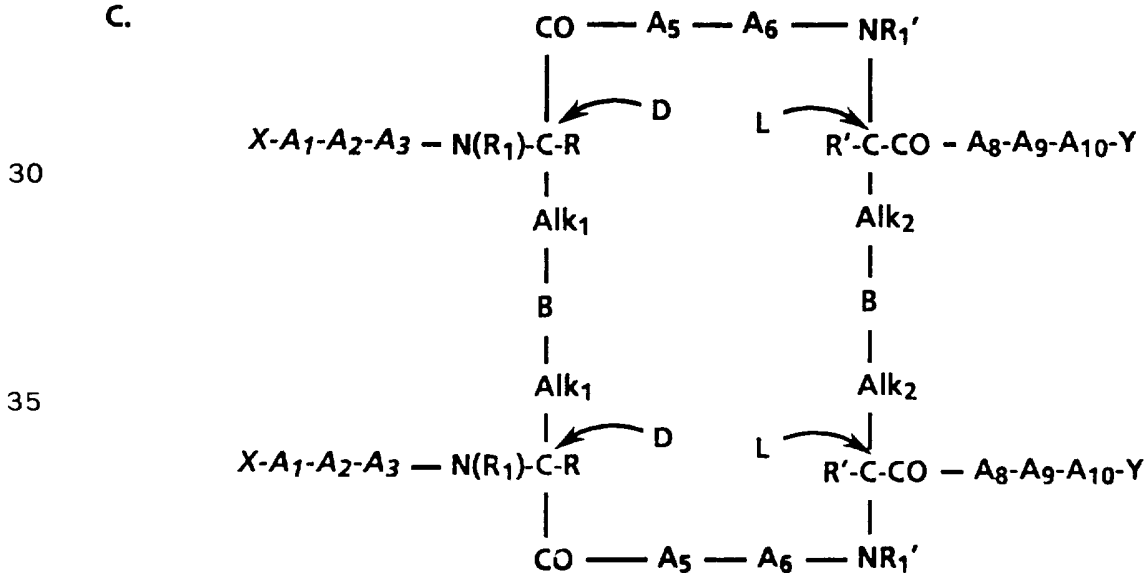
A.



B.



C.



vari

X är en aminoterminal rest, som väljes bland väte,  
en eller två alkylgrupper innehållande 1 - 6 kolatomer,  
en eller två acylgrupper innehållande 2 - 10 kolatomer,  
5 karbobensyloxi eller t-butyloxikarbonyl,

A<sub>1</sub> är en bindning eller Gly-Asp;

A<sub>2</sub> är Phe;

A<sub>3</sub> är Glu;

A<sub>5</sub> är Ile;

10 A<sub>6</sub> är Pro;

A<sub>8</sub> är Glu;

A<sub>9</sub> är Tyr-Leu;

A<sub>10</sub> är en bindning eller Gln;

Y är en karboxiterminal rest, som väljes bland OH,  
15 (C<sub>1-6</sub>)-alkoxi, amino, mono- eller di-(C<sub>1-4</sub>)-alkylsubstitue-  
rad amino, eller bensylamino;

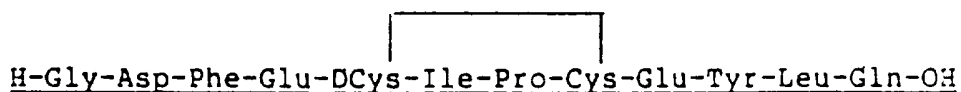
R, R', R<sub>1</sub> och R<sub>1</sub>' väljes var för sig bland väte  
eller (C<sub>1-4</sub>)-alkylgrupper;

B väljes bland -S-, -S-S- eller S-Alk<sub>3</sub>-S-;

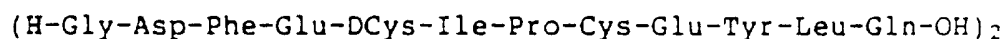
20 Alk<sub>1</sub>, Alk<sub>2</sub> och Alk<sub>3</sub> väljes var och en bland (C<sub>1-8</sub>)-  
metylengrupper;

och vari "D" och "L" anger att stereokemin för  
ifrågavarande kolatom motsvarar stereokemin för D-cystein  
och L-cystein, i nämnd ordning, k ä n n e t e c k n a t  
25 därav, att en lämpligt skyddad aminosyra med formeln A<sub>1</sub>  
bindes till den aktiverade hartsbäraren, de övriga alfa-  
aminoskyddade aminosyrorna med formlerna A<sub>2</sub>-A<sub>10</sub> bindes se-  
nare till den terminala ändan hos den växande peptidked-  
jan, från vilken däremellan aminoskyddsgruppen har av-  
30 lägsnats, och till sist utsättes den lineara peptiden för  
oxidativ koppling.

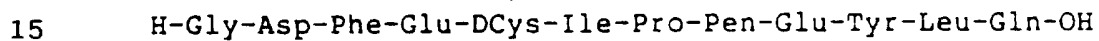
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -  
t e c k n a t därav, att man framställer



5            3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -  
t e c k n a t därav, att man framställer



4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -  
t e c k n a t därav, att man framställer



5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -  
t e c k n a t därav, att man framställer

20

