

SZABADALMI LEÍRÁS

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

A bejelentés napja: (22) 1988. V. 20. (21) 2615/88

A bejelentés elsőbbsége: (33) US
(32) 1987. V. 21.
(31) 053.204

A közzététel napja: (41)(42) 1989. I. 30.

Megjelent: (45) 1989. 11. 28.

(11)

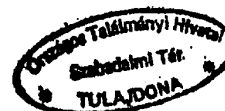
198512

B

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO,

C 07 K 7/08

A 61 K 37/64



Feltaláló(k): (72)

Krstenansky, John L. Cincinnati, Mao, Simon J.T. US
Loveland, Ohio

Szabadalmas: (71)

Merrell Dow Pharmaceuticals Inc. US Cincinnati, Ohio

(54)

Eljárás antikoaguláns hatású peptid és az ezt tartalmazó gyógyszerkészítmény előállítására

(57)KIVONAT

A találmány antikoaguláns hatású új (1) képletű H-Gly-Asp-Glu-Ile-DCys-Glu-Glu-Cys-Leu-Gln-OH (1) peptid előállítására vonatkozik.

A találmány szerint úgy járnak el, hogy a megfelelő védett kiindulási aminosavak alkalmazásával szilárd fázisú szintézissel a lineáris peptidet állítják elő, amelyet oxidatív kapcsolási reakciónak vetnek alá.

A találmány tárgya eljárás új ciklikus peptid előállítására, amely antikoaguláns hatással rendelkezik.

Az antikoaguláns szerek alkalmas terápiás hatóanyagok, például akut mélyvénás trombózis, tüdőembólia, akut artériás embólia, szívizom infarktus és elszórt éren belüli koaguláció gyógyszerészeti kezelésére. Az antikoaguláns szerek megelőző alkalmazása lehetővé teszi a reumatikus vagy érlemezsedéses szívbetegségekben szenvedő betegek esetében az embólia visszatérésnek megakadályozását és megakadályozza sebészeti beavatkozások során bizonyos thrombus-embólia kialakulását. Antikoagulánsok adagolása történik szívkoszorú verőér és agyérrendszeri betegségekben szenvedők kezelése esetében is. Az artériás trombózis, különösen a szívizmot és az agyat ellátó artériák esetében az elhalozás egyik fő oka.

A hirudin egy 65 egységéből álló polipeptid, amelyet plóca nyálmirigyéből izoláltak. Ez egy olyan antikoaguláns, amely thrombin specifikus inhibitor hatással rendelkezik. A hirudin ugyan igen jó hatékonyságú, de a plóca nyálmirigyéből izolált anyag klinikai alkalmazása mennyiségénél fogva limitált. Ezen túlmenően az izolált anyag drága és alkalmazását, mint minden ilyen méretű fehérje adagolását allergiás reakciók követik.

A szerzők felfedezték, hogy a hirudin egy specifikus részlete felelős, legalább részben antikoaguláns hatásáért. A részlet molekulát kémiai úton előállítottuk és ennek bizonyos ciklusos analógjairól kitudtunk, hogy a thrombin felismerési helyére kötődnek, de nem kötődnek az ettől térben elkülönülő thrombin enzimatomikus hasítási helyére. A szintetikus peptidok kötődése tökéletesen meggátolja a fibrinogén megkötődését a thrombin felismerési helyekre, ami előfeltétele a fibrin keletkezésének és a vérrög képződésének. A találmány szerinti eljárással előállított peptidok jelentős antikoaguláns aktivitással rendelkeznek és az a szokatlan jellemzőjük, hogy csak a thrombin felismerési helyhez kötődnek és nem kötődnek a thrombin enzimatomikus hasítási helyéhez, lehetővé teszi egy tudományosan érdekes és terápiásan jelentős antikoaguláns gyógyítási eljárás megvalósítását.

A találmány tárgya eljárás új (1) képletű, H-Glu-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-DCys-Glu-Glu-Cys-Leu-Gln-OH (1) peptidnek szilárd fázisú szekvenciális vagy blokk szintézis eljárással történő előállítására.

A találmány szerinti eljárással előállított fenti vegyület antikoaguláns hatással rendelkezik.

A találmány szerinti eljárás leírásában az aminosavak rövidítésére az alábbi jelöléseket használjuk:

Leu – leucin

Ile – izoleucin

Phe – fenil-alanin

Glx – glutaminsav- vagy glutamin

Cys – cisztein

Gln – glutamin

Asp – aszpargin sav

Glu – glutaminsav

DCys – D-cisztein.

A fent említettek közül természetesen előforduló aminosavak a leucin, az izoleucin, a fenil-alanin, a cisztein, a glutaminsav és a glutamin, lipofil aminosavak pedig a Phe, Leu és Ile aminosavak.

A természetesen előforduló aminosavak a glicin kivételével királis szénatomot tartalmaznak. Hacsak másképp nem jelezzük, a megadott optikailag aktív

aminosavak alatt ezek L-konfigurációját értjük. Mint a szakirodalomban ez szokásosan alkalmazott, a peptid szerkezetét úgy írjuk fel, hogy az amino terminális egység a lánc baloldalán és a karbocil terminális egység a jobb oldalán található.

A találmány szerinti eljárás során az (1) képletű peptidet szilárd fázisú szekvenciális szintézissel állítjuk elő. A szilárd fázisú szekvenciális eljárást automata peptid szintetizátor alkalmazásával hajthatjuk végre. Ebben az esetben az α -aminocsoporton védett aminosavat kötjük a gyanta hordozóhoz. Az alkalmazott gyanta hordozó lehet bármely polipeptid szilárd fázisú előállításban szokásosan alkalmazott gyanta, és előnyösen polisztirol, amely körülbelül 0.5–3% divinil-benzol keresztkötéseket tartalmaz, és amely vagy klórmetilezett vagy hidroximetilezett, amely funkciócsoportok alkalmasak a kezdetben bevezetett α -aminocsoporton védett aminosavval való észterkötés létrehozására.

Egy hidroxil-metil-gyantát írt le Bodanszky és csoportja Chem.Ind. (London), 38, 1597-98 (1966.) közleményében.

Egy klór-metilezett gyanta kereskedelemben kapható, a Bio Rad Laboratories, Richmond, California terméke. A klór-metilezett gyanta előállítási eljárást közölték Stewart és mtsal. Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman and Co., San Francisco 1969.), Chapter I, pp.1-6 közleményükben. A védett aminosavat a gyantához Gisin, Hevl.Chim.Acta, 56, 1476 (1973) közleményében leírt eljárása szerint kapcsolhatjuk. Számos gyantához kötött védett aminosav kereskedelemben kapható.

Miután az α -aminocsoporton védett aminosavat a gyanta hordozóhoz kötöttük, alkalmas eljárással, például diklórmetánban trifluor-ecetsavat alkalmazva, tiszta trifluor-ecetsavat alkalmazva, vagy dioxános só-savat alkalmazva, a védőcsoportot eltávolítjuk. A védőcsoport eltávolítását körülbelül 0 °C-szobahőmérséklet közötti hőmérsékleten végezzük. Más speciális α -aminosav védőcsoport eltávolításra alkalmas standard hasítási eljárások is alkalmazhatók. Miután α -aminocsoport védőcsoportot eltávolítottuk, a többi aminocsoporton védett aminosav a kívánt sorrendben kapcsolható a molekulához. Más eljárás szerint több aminosavból álló fragmenseket állítunk elő oldatban kapcsolási eljárással, és ezt kapcsoljuk a gyantához kötött aminosav szekvenciához.

A polipeptid szekvenciába bevezetett egyes α -aminocsoporton védett aminosavak esetében az alkalmazott aminocsoport védőcsoport bármely ilyen, a szakirodalomban ismert védőcsoport lehet. Az alkalmazható α -aminocsoport védőcsoportok az elábbiak lehetnek: (1) acil típusú védőcsoportok, mint például formilcsoport, trifluor-acetil-csoport, ftalil-csoport, toluol-szulfonil-csoport (tozilcsoport), benzilszulfonil-csoport, nitro-fenil-szulfenil-csoport, tritilszulfenil-csoport, o-nitro-fenoxil-acetil-csoport, és α -klór-butil-csoport, (2) aromás uretán típusú védőcsoportok, mint például benziloxi-karbonil-csoport, szubsztituált benziloxi-karbonil-csoportok, mint például p-klór-benziloxi-karbonil-csoport, p-nitro-benziloxi-karbonil-csoport, p-brom-benziloxi-karbonil-csoport, p-metoxil-benzil-oxil-karbonil-csoport, 1-(p-bifenil)-1-metil-etoxil-karbonil-csoport, α - α -dimetil-3,5-dimetoxil-benziloxi-karbonil-csoport, és benzilhidroxil-karbonil-cso-

port, (3) alifás uretán típusú védőcsoportok, mint például t-butoxi-karbonil-csoport (Boc), diizopropil-metoxi-karbonil-csoport, izopropoxi-karbonil-csoport, etoxi-karbonil-csoport, és alliloxi-karbonil-csoport, (4) cikloalkil uretán típusú védőcsoportok, mint például ciklopentiloxi-karbonil-csoport, adamantiloxi-karbonil-csoport, és ciklohexiloxi-karbonil-csoport (Chx), (5) tiouretán típusú védőcsoportok, mint például feniltio-karbonil-csoport, (6) alkil típusú védőcsoportok, mint például trifenil-metil-csoport (tritol-csoport) és benzilcsoport, és (7) trialkil-szilil-csoportok, mint például trimetil-szilil-csoport. Az előnyösen alkalmazható α -aminocsoport védőcsoport a t-butoxi-karbonil-csoport.

A megfelelő kapcsoló reagens kiválasztása a szakember előtt ismert. Különösen alkalmas kapcsoló reagens, amennyiben a kapcsolt aminosav Gln, az N,N'-diizopropil-karbohidimid és az l-hidroxi-benzotriazol. Ezeknek a reagensnek az alkalmazásával elkerülhető a laktám és nitril melléktermékek keletkezése. Más kapcsoló reagens: (1) a karbohidimidek (például az N,N'-dicklohexil-karbohidimid és az N-etil-N-(γ -dimetil-amino)-propil-karbohidimid), (2) a cianamidok (például az N,N'-dibenzil-cianamid), (3) a ketiminek, (4) az izoxazólium sók (például az N-etil-5-fenil-izoxazólium-3'-szulfonát), (5) monociklusos aromás jellegű nitrogén tartalmú vegyületek, amelyek 1-4 nitrogénatomot tartalmazhatnak, mint például imidazolidok, pirazolidok, és 1,2,4-triazolidok. Például alkalmas heterociklusos amidokon az N,N'-karbonil-diimidazol, és az N,N-karbonil-di-(1,2,4-triazol), (6) alkoxilezett acetilének (mint például etoxi-acetilén), (7) az aminosav karboxilcsoportjával vegyes anhidridet képző reagens (mint például etil-klór-formiát, és izobutil-klór-formiát), vagy a kapcsolandó aminosav szimmetrikus anhidridjei (például Boc-Ala-O-Ala-Boc), és (8) nitrogéntartalmú heterociklusos vegyületek, amelyek a gyűrű nitrogénatomon hidroxilcsoportot tartalmaznak, mint az N-hidroxi-ftalimid, az N-hidroxi-szukcinimid és az l-hidroxi-benzotriazol. Más aktiváló peptid kapcsoló reagensket írt le közleményében Kapoor, J.Pharm.Sci. 59. pp 1-27 (1970). Az előnyösen alkalmazható kapcsoló reagens, az Arg, Asn és Gln aminosavak kivételével, a szimmetrikus anhidridek.

Valamennyi védett aminosavat vagy aminosav szekvenciát 4-5-szörös feleslegben visszük a szilárd fázisú reaktorba és a kapcsolást dimetil-formamid: diklórmetán (1:1) elegyben, vagy tiszta dimetil-formamidban, vagy előnyösen tiszta diklórmetánban hajtjuk végre. Amennyiben a kapcsolat nem teljesen történik meg, a kapcsolási eljárást megismételjük mielőtt az α -amino-védőcsoportot eltávolítjuk és a következő aminosavat a szilárd fázisú reaktorba visszük. A kapcsolási reakció végbemenetelét a szintézis minden egyes lépésében ninhidrin tesztvizsgálattal ellenőrizzük, Kaiser és mtsai. által az *Analyt Biochem.*, 34. 595 (1970) közleményében leírt eljárásnak megfelelően.

Miután a kívánt aminosav szekvenciát előállítottuk, a peptidet eltávolítjuk a gyantáról. Ezt hidrolízis segítségével végezzük, és például a gyantához kötött polipeptidet dimetil-szulfid, p-krezol vagy tiokrezol híg vizes hidrogénfluorid oldatával kezeljük.

Mint a szilárd fázisú szintézis szakrodalmában ismert számos aminosav olyan funkció csoportokat

tartalmaz, amelyeket a peptid lánc előállításánál védőcsoporttal kell ellátni. A megfelelő védőcsoport kiválasztása, alkalmazása, a szakember előtt ismert és a védőcsoporttal ellátandó aminosav minőségétől, valamint a peptidben jelenlévő egyéb védőcsoporttal ellátott aminosavak minőségétől függ. Az ilyen oldalláncban védőcsoportok megválasztása döntő befolyású, mert ezek olyanok kell legyenek, amelyek nem hasadnak le az α -aminocsoport védőcsoportok eltávolítása során. Például alkalmas oldallánc funkció csoport védőcsoportok a lizin esetében a benziloxi-karbonil-csoport és a szubsztituált benziloxi-karbonil-csoportok, ahol a szubsztituens lehet halogénatom (például klóratom, brómatom, fluoratom) és nitro csoport (például 2-klór-benzil-oxi-karbonil-csoport, p-nitro-benziloxi-karbonil-csoport, 3,4-diklór-benziloxi-karbonil-csoport), a tozilcsoport, a t-amiloxi-karbonil-csoport, a t-butoxi-karbonil-csoport, és a diizopropil-metoxi-karbonil-csoport. A treonin és szerin alkoholos hidroxilcsoportja acetilcsoport, benzilcsoport, t-butil-csoport, tritol-csoport, benzilcsoport, 2,6-diklór-benzil-csoport, vagy benziloxi-karbonil-csoport védőcsoporttal védhető. Előnyösen alkalmazható védőcsoport a benzilcsoport.

Ezek a csoportok a szakirodalomban ismert eljárásokkal távolíthatók el. Jellemzően a védőcsoport eltávolítást a teljes peptidlánc szintézisének befejezése után végezzük, de ezek bármely más megfelelő lépésben is eltávolíthatók.

A ciklikus peptideket általában a megfelelő lineáris származékból állítjuk elő a lineáris peptid szilárd fázisról való lehasítása után vagy ezt megelőzően. Az (1) képletű vegyületet, amely diszulfid-csoportot (-S-S-) tartalmaz a megfelelő szabad tiolcsoportot tartalmazó lineáris peptidből állíthatjuk elő ismert oxidatív kapcsolási eljárással, például a lineáris peptidet káliumferricianiddal oxidálva, például Stewart és mtsai. *Solid Phase Peptide Synthesis* (Freeman and Co, San Francisco 1969), Chapter 1, p.95 közleményében leírt eljárása szerint.

A találmány szerinti eljárással előállított peptid antiaguláns dózisa 0.2 mg/kg-250 mg/kg testtömeg nap, amely függ a kezelt betegétől és az alkalmazott peptidről. Az adott beteg esetében a szükséges dózist egyedileg kell meghatározni. Előnyösen 1-4 napi dózist adagolunk, jellemzően 5 mg-100 mg/dózis aktív hatóanyag alkalmazásával.

A jelzett antikoaguláns terápia számos trombózis megelőzésére alkalmas és különösen alkalmas a szív-koszori verőér és agyi érrendszeri betegségek kezelésére. A szakember számára egyértelmű az ilyen jellegű betegségek kör, amelyek ilyen kezelést igényelnek. A beteg elnevezés alatt emlősöket, mint például főemlősöket, például embert, juhot, lovat, szarvasmarhát sertés, kutyát, macskát, patkányt és egereket értünk.

Általában a peptid stabil marad orálisan adagolva is, azonban a nem orális úton történő adagolás, például a szubkután, az intravénás, az intramuszkuláris vagy intraperitoneális adagolás alkalmazandó előnyösen, a tároló injekció, beültetett injekció, vagy nyálkamembránon keresztül alkalmazás, mint például orr, torok és tüdő hörgőkön keresztül alkalmazás előnyös, ami lehet például aeroszol formált alak, amely a találmány szerinti peptid származékot szpré, vagy száraz por formában tartalmazza.

Parenterális adagolás céljára a találmány szerinti

vegyület injektálható dózisekben oldat vagy szuszpenzió formában adagolható fiziológiásan elfogadható hígítóanyagba, gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyagokkal együtt, amelyek lehetnek steril folyadékok, mint például víz vagy olajok, és a formált alakban kívánt esetben más felületaktív anyagokat és más gyógyszerészetileg elfogadható adalékanyagokat is alkalmazhatunk. Alkalmazható olajok például ásványolaj, amely állati, növényi vagy szintetikus eredetű lehet, és lehet például földimogyoróolaj, szójaolaj, és ásványi olaj. Folyékony hordozóanyagként különösen injektálható formált alak esetében előnyösen víz fiziológiás sóoldat, dextróz oldat és hasonló cukoroldatok, etanol és glikolok, mint például propilén-glikol vagy polietilén-glikol alkalmazhatók.

A találmány szerinti vegyület mint tartalék injekció vagy mint beültetett készítmény adagolhatók és olyan formában készíthetők, amely lehetővé teszi az aktív hatóanyag fenntartott kibocsátását. Az aktív hatóanyag labdacsokká vagy kis hengerekké préselhető és szubkután vagy intramuszkulárisan beültethető, mint tartalék injekció vagy beültetett hatóanyag. A beültetett formált alakban inert anyagokat mint például biológiailag lebontható polimereket vagy szintetikus szilikonokat, például Silastic-ot (egy szilikon gumi, amelyet a Dow-Corning Corporation állít elő) alkalmazhatunk.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példán részletesen bemutatjuk.

Példa

H-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-DCys-Glu-Glu-Cys-Leu-Gln-OH előállítás

A peptidet szilárd fázisú eljárással 0.1 mmól 0.66 mmól/g Boc-Gln-Pam gyanta alkalmazásával állítjuk elő. Kétszeres szimmetrikus anhidridet alkalmazó kapcsolást hatunk végre 2.0 mmól Na-Boc-aminosav (Peptides International) alkalmazásával, kivéve hogy a Boc-Gln esetében DCC/HOBT módszert alkalmazunk

a kapcsolásra. Az oldalláncban alkalmazott védőcsoportok az alábbiak: Asp(Chx), Cys(pMeBzl), Glu(Bzl).

Miután a szintézis befejeződött, a Na-Boc védőcsoportot 50%-os diklórmétános trifluor-ecetsav segítségével távolítjuk el. A gyantát háromszor diklórmétánnal mossuk, háromszoros 10%-os diizopropil-etil-aminos diklórmétános oldattal történő mosással semlegesítjük, majd háromszor diklórmétánnal mossuk. Ezután N-acetilimidazzal diklórmétánban acetilezzük, majd háromszor diklórmétánnal mossuk és vákuumban megszáritjuk.

A peptidet a gyantáról lehasítjuk és egyben a védőcsoportokat eltávolítjuk. Ezt a műveletet vízzel végezzük, amelynek pH értékét ammóniumhidroxiddal 8.5 értékre állítjuk be. Ezután kállumferriacianidot adunk az oldathoz (0.01 n) amíg a sárga szín állandóvá nem válik. Az oldatot 30 percig keverjük, majd a pH értéket ecetsavval 4-5 értékre állítjuk be. Ezután az elegyet Bio-Rad AG3-X4A ioncserélő gyantával keverjük 2 óráig. A keveréket leszűrjük és a szűrletet liofilizáljuk.

A peptidet 92x2.6 cm Sephadex G-15 oszlopon 5%-os ecetsavval történő átfolyatással sómentesítjük, majd liofilizáljuk. Ezután HPLC segítségével C¹⁸ Vydac 21BTP1010 (250x10 mm) oszlopon, 0.1% vizes trifluorecetsavban készült acetonitril-eluens és 5 ml/perc sebesség alkalmazásával tisztítjuk. A fő komponens gyűjtjük és liofilizáljuk és így a kívánt terméket kapjuk. A termék homogenitását HPLC és VRK analízissel határozzuk meg. HPLC Vydac 21BTP54 (250x4.6 mm) C¹⁸ oszlop, 2 ml/perc, t_r=1.8 perc; eluációs idő 25-50% acetonitril tartalmú 0.1%-os trifluorecetsav alkalmazásával lineáris gradiens mellett, amely 1% perc. (HPLC) 5.5 perc.

FAB-MS: (M+H) = 1411.7 ± 1 mikron (számított 1.410). Aminosav analízis: (6n sósavas hidrolízis, 24 óra időtartamig, 106 °C hőmérsékleten), lásd az 1. táblázatot, 1.58 tömeg% peptid tartalom.

1. táblázat

Aminosav analízis (6n HCl, hidrolízis: 24 óra, 106 °C)

His	Asx	Ser	Glx	Pro	Ala	Gly	Ile ^x	Leu	Tyr	Phe
-	1.00(1)	-	5.05(5)	-	-	0.95(1)	0.60(1)	1.00(1)	-	1.02(1)

^xAz allo-Ile átalakulás a hidrolízis időtartama során nem teljes.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás az (1) képletű $\text{H-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-DCys-Glu-Glu-Cys-Leu-Gln-OH}$ (1) peptid előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a védett 1. aminosavat valamely aktív gyanta hordozóhoz kapcsoljuk, majd a többi védett aminosavat a növekvő peptid lánc aminocsoportjához kapcsoljuk, a peptid láncról a védőcsoportokat

és a gyantát eltávolítjuk, végezetül a lineáris peptidet oxidatív kapcsolási reakciónak vetjük alá.

2. Eljárás antikoaguláns hatású gyógyszerkészítmény előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy hatóanyagként az 1. igénypont szerinti eljárással előállított (1) képletű peptidet gyógyszerészetileg elfogadható hordozóanyaggal és kívánt esetben adalékanyaggal összekeverjük és gyógyszerkészítménnyé dolgozzuk.

rajz nélkül

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal
Felelős kiadó: Himer Zoltán o.v.

KÓDEX