

(19)



(10)

LT 4218 B

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

-
- (11) Patento numeris: **4218**
- (21) Paraiškos numeris: **96-151**
- (22) Paraiškos padavimo data: **1996 10 25**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **1997 05 26**
- (45) Patento paskelbimo data: **1997 09 25**
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/US95/05268**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1995 04 25**
- (85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1996 10 25**
- (31, 32, 33) Prioritetas: **233054, 1994 04 26, US**
- (72) Išradėjas:
Fahad Al-Obeldi, US
Michal Lebl, US
James A. Ostrem, US
Pavel Safar, US
Alena Stierandova, US
Peter Strop, US
Armin Walser, US
- (73) Patento savininkas:
SELECTIDE CORPORATION, 1580 East Hanley Boulevard, Tucson,
Arizona 85737-9525, US
- (74) Patentinis patikėtinis:
Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A. Baltic Service Company,
Rūdninkų g. 18/2-12, 2001 Vilnius, LT
-

- (54) Pavadinimas:
Faktoriaus Xa inhibitoriai

- (57) Referatas:

Išradime pateikiami junginiai, specifiskai inhibuojantys Faktoriaus Xa aktyvumą. Junginių bendra formulė yra $X_1\text{-YIR-X}_2$, kurioje X_1 yra H, acilas, alkilas, acilalkilas, arilalkilas arba viena ar kelios aminorūgštys, X_2 yra modifikuota C-galinė grupė, viena ar kelios karboksilų blokuojančios grupės arba viena ar kelios aminorūgštys ar kitas pakaitas, Y, I ir R yra, atitinkamai, tirozinas, izoleucinas ir argininas, arba į peptidą panašios ar organinės struktūros, turinčios tokį patį funkcinį aktyvumą kaip, atitinkamai, Y, I ir R. Be to, šis išradimas pateikia junginį, kurio bendra formulė yra $A1\text{-A2-(A3)}_m\text{-B}$, kurioje m yra 0 arba 1. Išradimo junginys gali turėti linijinę arba ciklinę struktūrą iš 2-43 liekanų. Išradimo junginys charakterizuojamas dalinai tuo, kad specifiskai inhibuoja Faktoriaus Xa aktyvumą, jo $K_i \leq 100 \mu\text{M}$, geriausia $\leq 2 \text{ nM}$, ir žymiau neinhibuoja kitų proteazių, dalyvaujančių krešėjimo kaskadoje, aktyvumo. Išradime dar pateikiami specifinio Faktoriaus Xa aktyvumo inhibavimo ir kraujo krešėjimo *in vitro* ir individe inhibavimo būdai, bei Faktoriaus Xa kiekio ir aktyvumo nustatymo būdai.

5 Išradimas susijęs su kraujo krešėjimo baltymais, ypač su specifiniais kraujo krešėjimo fermento Faktoriaus Xa inhibitoriais.

10 Kraujo krešėjimas yra gyvybiškai svarbus. Tačiau, kai kurių ligų atveju kraujo krešulių susidarymas jau savaime yra ligos šaltinis. Taigi, kartais gali būti naudinga stabdyti kraujo krešulių formavimąsi. Tačiau nenaudinga pilnai inhibuoti krešėjimo sistemą, kadangi tai gali sukelti gyvybei pavojingą nukraujavimą.

15 Siekiant sumažinti kraujo krešulių susidarymą kraujotakos sistemoje, tos srities specialistai stengėsi surasti efektyvų protrombinazės arba Faktoriaus Xa, įjungto į protrombinazės kompleksą, kur jis aktyvuoja trombiną krešulių susidarymo metu, inhibitorių.

20 Tinkamos Faktoriaus Xa inhibitoriaus koncentracijos padidintų protrombinazę formuojančių agentų lygį, būtiną krešėjimui inicijuoti, bet, vos tik susidarius kritinei trombino koncentracijai, be reikalo netęstų krešėjimo proceso.

Tačiau, nepaisant seniai pripažinto tokių inhibitorių naudingumo, šiuo metu klinikiniam naudojimui nėra nė vieno efektyvaus specifinio Faktoriaus Xa inhibitoriaus.

25 Daugeliu klinikinių atvejų labai reikalingas anti-koaguliacinis gydymas. Šiuo metu turimi vaistai daugeliu specifinių klinikinių atvejų veikia nepakankamai. Pvz., apie 50 % pacientų, kuriems atliktas viso klubo sąnario pakeitimas, išsivysto giliųjų venų trombozė (DVT). Dabartiniu metu naudojama terapija apima fiksuotas mažo molekulinio svorio heparino (LMWH) ir kintamas heparino dozes. 30 Netgi naudojant tuos vaistų režimus, nuo 10 iki 20 % pacientų išsivysto DTT, o nuo 5 iki 10 % pacientų išsivysto nukraujavimo komplikacijos.

Dar viena klinikinė situacija, kurioje reikia geresnių antikoagulantų, apima pacientus, ruošiamus širdies kraujagyslių rekonstrukcijai ir esant miokardo infarkto rizikai arba sergančius progresuojančia stenokardija. Dabartinis, plačiai priimtas gydymo būdas, kuris susideda iš paskyrimo ligoniui heparino ir aspirino, yra susijęs su kraujagyslių užsikimšimo sumažinimu 6-8 % 24 val. bėgyje. Dėl heparino naudojimo kilusių nukraujavimo komplikacijų, reikalaujančių gydymo perpilant kraują, skaičius yra taip pat apie 7%. Dar daugiau, netgi nors vėlesni užsikimšimai yra reikšmingi, heparino skyrimas užbaigus procedūrą yra nevertingas ir gali būti žalingas.

Plačiausiai naudojami kraujo krešėjimo inhibitoriai yra heparinas ir panašūs sierą turintys polisacharidai, LMWH ir heparino sulfatas. Šios molekulės veikia kaip antikoagulantai surišdamos natūralų krešėjimo proceso reguliatorių anti-trombiną III su trombinu ir Faktoriu Xa. Inhibuojantis heparino aktyvumas pirmiausia nukreiptas į trombiną, kuris inaktyvuojamas apytikriai 100 kartų greičiau, negu Faktorius Xa. Nors ir giminingi heparinui, heparino sulfatas ir LMWH yra stipresni inhibitoriai Xa negu trombinui, skirtumas *in vitro* yra saikingas (3-30 kartų), o efektas *in vivo* gali būti nenusipėjamas. Hirudinas ir hirulogas, du trombinui specifiski antikoagulantai šiuo metu bandomi klinikose. Tačiau šie antikoagulantai, kurie inhibuoja trombiną, taip pat susiję su nukraujavimo komplikacijomis.

Priešklinikiniai bandymai su babuiniais ir šunimis parodė, kad specifiniai Faktoriaus Xa inhibitoriai sustabdo krešulių formavimąsi, nesukeldami pašalinių nukraujavimo efektų, stebimų naudojant tiesioginius trombino inhibitorius. Tokie Faktoriaus Xa inhibitoriai apima, pvz., 2,7-bis-(4-amidinobeziliden)-cikloheptanoną ir N α -tozilglicil-3-amidinofenilalanino metilo esterį ("TENSTOP"), kurių efektyvi inhibavimo koncentracija (K_i) yra atitinkamai, apie 20 nM ir 800 nM. (+)-(2S)-2-(4-((3S)-1-acetimidol-3-pirolidinil)oksi)fenil)-3-(7-

amidino)-2-naftil)propano rūgštis taip pat priklauso Faktoriaus Xa inhibitorių klasei (Katakura et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 197:965-972 (1993)). Tačiau ligi šiol šie junginiai nėra ištirti klinikoje.

5 Specifiniai baltyminiai Faktoriaus Xa inhibitoriai taip pat identifikuoti ir apima, pavyzdžiui, antistasiną ("ATS") ir erkės antikoaguliacinį peptidą ("TAP"). ATS, kuris yra išskirtas iš dėlės *Haementerin Officinalis*, sudarytas iš 119 aminorūgščių ir jo K_i Faktoriaus Xa atžvilgiu yra 0,05 nM. TAP, kuris yra išskirtas iš erkės *Ornithodoros moubata*, turi 60 aminorūgščių ir K_i apie 0,5 nM.

10 Rekombinantinių ATS ir TAP efektyvumas tyrinėtas keletose modelinių gyvulinių sistemų. Abu inhibitoriai sumažina kraujavimo laiką, lyginant su kitais antikoaguliantais ir stabdo krešėjimą esant tromboplastino indukuotam kaklo venų trombozės modeliui. Šiame modelyje gauti rezultatai koreliuoja su rezultatais, gautais naudojant dabar geriausią vaistą - hepariną.

15 Nustatyta, kad transderminis veikimas ATS-u yra efektyvus tromboplastinu indukuotame diseminuoto intravaskulinio koaguliacijos modelyje (DIC). TAP efektyviai užkerta kelią "high-shear" arterinei trombozei ir pratakumo sumažėjimui, sąlygotam poliesterinio ("DACRON") implantanto, tokiu mastu, kad duoda kliniškai priimtina nepilnai aktyvuoto tromboplastino laiko (aPTT) prailginimą, t.y., mažiau negu dukartinį prailginimą. Palyginimui, standartinis heparinas, netgi panaudotas dozėmis, sąlygojančiomis 5-kartinį aPTT prailginimą, nestabdo trombozės ir sumažinto pratakumo implantanto viduje. aPTT yra klinikinis testas koaguliacijai, ypač jautrus trombino inhibitoriams.

20 ATS ir TAP neištirti klinikoje. Pagrindinis šių dviejų inhibitorių trūkumas yra tai, kad reikalingų kartotinių dozių skyrimas iššaukia neutralizuojančių antikūnų susidarymą, kas apriboja jų potencialų klinikinį panaudojimą. Dar daugiau, TAP ir ATS kiekiai daro neįmanomą peroralinį skyrimą, tuo būdu pacientų, galinčių naudoti šiuos agentus, skaičius dar apribojamas.

Specifinis Faktoriaus Xa inhibitorius būtų esminiai naudingas medicininėje praktikoje. Faktoriaus Xa inhibitorius būtų ypač efektyvus situacijose, kuriose šiuo metu geriausi vaistai - heparinas ir panašūs sierą turintys polisacharidai yra neefektyvūs arba mažai efektyvūs. Taigi, egzistuoja poreikis specifiškam Faktoriui Xa mažos molekulinės masės kraujo krešėjimo inhibitoriui, kuris būtų efektyvus, bet nesukeltų nepageidaujamų šalutinių efektų. Šis išradimas patenkina tokį poreikį ir pateikia su tuo susijusią naudą.

Išradimas aprašo junginius, specifiškai inhibuojančius Faktoriaus Xa aktyvumą. Junginio pagal šį išradimą struktūra yra $X_1-Y-I-R-X_2$, kurioje X_1 yra vandenilis (H), acilas, alkilas arba arilalkilo grupė, arba viena ar kelios aminorūgštys, o X_2 yra modifikuota C-galinė grupė, viena ar kelios karboksilų blokuojančios grupės (žiūr. toliau), viena ar kelios aminorūgštys, arba kiti pakaitai, o Y, I ir R reiškia, atitinkamai, aminorūgštis tiroziną, izoleuciną ir arginimą ir peptidinę ar organinę grupę, turinčią tokį pat funkcinį aktyvumą kaip, atitinkamai, tirozinas, izoleicinas ir argininas. Be to, išradimo junginys turi struktūrą $A1-A2-(A3)_m-B$.

Išradimo junginys gali būti tiesios grandinės arba ciklinis, turėti 2-43 liekanas ir būti modifikuotas N- arba C-gale arba abiejuose. Tokie junginiai specifiškai inhibuoja Faktoriaus Xa aktyvumą, jų $K_i \leq 100 \mu M$, geriausia $K_i \leq 2 \text{ nM}$, ir iš esmės neinhibuoja kitų proteazių, dalyvaujančių koaguliacijos kaskadoje, aktyvumo. Tokių junginių konkretūs pavyzdžiai yra Ac-Tyr-Ile-Arg-Leu-Ala-NH₂; Ac-Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-(iBu)Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-Tyr-Ile-Arg-N(CH₃)O(CH₃); Ac-Tyr-{Ψ(CH₂NH)}-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂ (kur "Ψ" reiškia pseudopeptidinį ryšį, kuris, pvz., gali būti redukuotas, kas yra žymima "(CH₂NH)"; pseudopeptidinis ryšys žymimas "Ψ" skliaustuose: "{Ψ}"); Ac-Tyr-Ile-Arg-NH-CH₂(4-piridil); Ac-Tyr-Ile-{Ψ(CH₂NH)}-

Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-Tyr-Chg-Arg(NO₂)-{Ψ(CH₂NH)}-Leu-NH₂;
 Ac-Tyr-Ile-Arg-{Ψ(COCH₂)}-Gly-Pro-NH₂; Ac-Tyr-Ile-Dab(N^γ-
 C₃H₇N)-Leu-Ala-NH₂; Ac-Tyr-Ile-PalMe(3)-NH₂; Tyr-Ile-Arg-NH₂;
 (D)-Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-(Bzl)Gly-(Chx)Gly-(3-
 5 guanidopropil)Gly-NH₂; ciklo(Gly-Tyr-Ile-Arg-Gly); Tfa-(iBu)Tyr-Chg-
 Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-pAph-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-Nal(2)-Chg-
 Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂; ir jų farmaciškai
 priimtinos druskos bei dariniai, modifikuoti C-gale, tokie kaip jų
 amidai, esteriai, alkoholiai ir aldehidai (žiūr. taip pat 5 lentelę). Taip pat
 10 pateikiami konkretūs Faktoriaus Xa inhibavimo ir kraujo krešėjimo
 inhibavimo gyvame individe būdai, o taip pat Faktoriaus Xa
 koncentracijos ir aktyvumo nustatymo metodai.

TRUMPAS BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

15

Fig.1 yra kraujo krešėjimo kaskados schema.

Fig.2 yra bendra junginio pagal šį išradimą formulė.

Fig.3 yra išradimo junginių sintezės schema.

20

Kraujo krešėjimas yra sudėtingas procesas, apimantis palaipsniui
 besiplečiančią fermento aktyvavimo reakcijų seriją, kurioje plazmos
 profermentai yra palaipsniui aktyvuojami, dalinai juos suskaidant.
 Mechaniškai kraujo krešėjimo procesas skirstomas į vidinį ir išorinį
 25 būdus, kurie turi bendrą etapą - Faktoriaus Xa aktyvavimą; tolesnis
 trombino generavimas vyksta vienu bendru būdu (žiūr. Fig.1).

30

Dabartiniai duomenys duoda pagrindo manyti, kad vidinis būdas
 yra svarbus fibrino siūlų susidarymui ir augimui, tuo tarpu kai išorinis
 būdas nulemia pradinę kraujo krešėjimo fazę. Priimta manyti, kad
 kraujo krešėjimą inicijuoja audinių faktoriaus-Faktoriaus VIIa
 kompleksas. Susidaręs šis kompleksas greitai inicijuoja krešėjimą,

aktyvuodamas Faktorius IX ir X. Po to naujai susidaręs Faktorius Xa sudaro 1:1 kompleksą su Faktoriu Va ir fosfolipidais, sudarydamas protrombinazės kompleksą, atsakingą už tirpaus fibrinogeno virstimą netirpiu. Laikui bėgant, audinių faktoriaus-Faktoriaus VIIa kompleksą (išorinis būdas) slopina Kunitz'o tipo proteazės baltyminis inhibitorius, kuris, susijungęs su Faktoriu Xa, gali tiesiogiai inhibuoti proteolitinį Faktoriaus VIIa-audinių faktoriaus aktyvumą. Siekiant palaikyti krešėjimo procesą esant inhibuotai išorinei sistemai, papildomas Faktorius Xa gaminasi dėka trombino perduodamo aktyvumo. Tokiu būdu, trombinas vaidina dvigubą autokatalitinį vaidmenį, skatindamas savo paties gamybą ir fibrinogeno virstimą į fibriną.

Autokatalitinė trombino susidarymo prigimtis yra svarbi apsauga nuo nekontroliuojamo nukraujavimo ir tai užtikrina, kad, jei yra tam tikras kritinis protrombinazės lygis, kraujo krešėjimas vyks iki galo, sąlygodamas, pavyzdžiui, kraujavimo nutrūkimą. Taigi, naudingiausia išrasti agentus, kurie inhibuotų krešėjimą tiesiogiai neinhibuodami trombino.

Šis išradimas pateikia peptidus YIR, kurie yra junginiai, inhibuojantys Faktoriaus Xa aktyvumą, bet žymiau neinhibuoja kitų proteazių, dalyvaujančių kraujo krešėjimo procese, aktyvumo. Ta prasme, kaip panaudota aprašyme, terminas "junginys" arba "peptidas YIR" reiškia negamtinį peptidą Tyr-Ile-Arg (YIR) ir jo analogus, galinčius inhibuoti Faktoriaus Xa aktyvumą. Pati YIR seka čia vadinama "YIR motyvu" ir yra tirozino-izoleucino-arginino tripeptidas arba jo funkcinis analogas, toks kaip pAph-Chg-PalMe(3), pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂ ir pAph-Chg-AMP(4) (žiūr. 1 lentelę dėl sutrumpinimų). Tokie išradimo junginiai turi bent vieną YIR motyvą arba jo funkcinį ekvivalentą ir specifiškai inhibuoja Faktoriaus Xa aktyvumą. Patogumo dėlei, terminai "junginys" ir "YIR peptidas" čia plačiai naudojami apibūdinimui išradimo peptidų, tame tarpe jų funkcinio ekvivalentų, tokių kaip peptidų analogai, panašūs į peptidus

junginiai ir sintetiniai organiniai junginiai. Išradimo peptidų YIR funkcinis ekvivalentas iš dalies gali būti apibūdintas kaip turintis čia atskleistą struktūrą ir $K_i \leq 100 \mu\text{M}$ Faktoriaus Xa inhibavimo reakcijoje.

YIR peptidų analogai apima, pavyzdžiui, peptidus, sudarytus iš negamtinių aminorūgščių arba chemiškai modifikuotų aminorūgščių, su sąlyga, kad junginys išlaiko Faktorių Xa inhibuojantį aktyvumą (žiūr., pvz., 2 lentelę). Panašiai, panašūs į peptidus junginiai yra ne aminorūgščių cheminės struktūros, kurios imituoja išradimo peptidų YIR struktūrą ir išlaiko Faktoriaus Xa inhibitoriaus aktyvumą. Tokie panašūs į peptidus junginiai paprastai charakterizuojami panašiomis fizikinėmis savybėmis, tokiomis kaip dydis, krūvis ar hidrofobiškumas ir yra atitinkamos erdvinės orientacijos kaip ir normalūs YIR peptidai. Tam tikri pavyzdžiai į peptidus panašių junginių, kuriuose amidinis ryšys prie vienos ar kelių aminorūgščių yra pakeistas, pavyzdžiui, C-C ryšiu ar kitu, gerai žinomi šioje srityje (žiūr., pavyzdžiui, Sawyer, Peptide Based Drug Design pp. 387-422 (ACS, Washington DC 1995), kuris čia cituojamas). Tokiu būdu, išradimas dar pateikia Faktorių Xa inhibuojančius junginius, turinčius struktūrą $A1-A2-(A3)_m-B$, kurioje m yra 0 arba 1, kaip čia atskleista (žiūr. toliau). Tokių peptidų, kurie gali būti panašūs į peptidus junginiai, pavyzdžiai taip pat pateikiami.

Terminas “aminorūgštis” čia vartojamas plačiausia prasme ir reiškia dvidešimt gamtinių aminorūgščių, kurios transliuojamos nuo genetinio kodo ir sudaro baltymus; terminas apima, jei atskirai nepažymėta kitaip, L- ir D-aminorūgštis, taip pat chemiškai modifikuotas aminorūgštis, tokias kaip aminorūgščių analogai, gamtinės aminorūgštys, paprastai neįeinančios į baltymų sudėtį, tokios kaip norleucinas, ir chemiškai susintetinti junginiai, turintys aminorūgštims charakteringas savybes. Pavyzdžiui, fenilalanino ar prolino analogai ar panašūs junginiai, apsprendžiantys tuos pačius peptidinių junginių konformacijos apribojimus kaip ir natūralūs Phe ir Pro, įeina į aminorūgščių sąvoką ir yra žinomi specialistams. Tokie analogai ir

panašūs junginiai čia vadinami “funkciniais aminorūgščių ekvivalentais”. Kiti aminorūgščių ir aminorūgščių analogų pavyzdžiai išvardinti Roberts ir Vellaccio, The Peptides: Analysis, Sythesis, Biology, Eds. Gross and Maienhofer, vol. 5, p. 341, Academic Press, Inc., N.Y. 1983, kuris čia cituojamas. Aminorūgščių, aminorūgščių analogų ir panašių struktūrų sutrumpinti žymėjimai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Žymėjimai, naudojami išradimo aprašyme

10

Junginys	Sutrumpini- mas 1	Sutrumpini- mas 2
Acetil	Ac	
Alaninas	Ala	A
3-(2-tiazolil)-L-alaninas	Tza	
Amidinas	AMDN	
Amidoksimas ($C(NH_2)=N-OH$)	(CNOH.NH ₂	
(N-metilpiridinium)metilas	AMP	
(4-(N-metilpiridinium))metilas	AMP(4)	
1-(N-metilpiridinium)et-1-ilas	AEMP	
1-(4-(N-metilpiridinium)et-1-ilas	AEMP(4)	
Argininas	Arg	R
Asparaginas	Asn	N
Asparto rūgštis	Asp	D
Benzoilas	Bz	
2-benzofurankarboksilas	Bzf	
Benzilas	Bzl	
Benziloksikarbonilas	Cbz	
5-benzimidazolkarboksilas	5-Bzim	
t-Butiloksikarbonilas	Boc	
Benzotriazol-1-iloksi-tris-(dimetilamino)-	Bop	

fosfonio heksafluorofsfatas		
β -alaninas	β Ala	
β -valinas	β Val	
β -(2-piridil)-alaninas	Pal(2)	
β -(3-piridil)-alaninas	Pal(3)	
β -(4-piridil)-alaninas	Pal(4)	
β -(3-N-metilpiridinium)alaninas	PalMe(3)	
Brom-tris-pirolidinofosfonio	PyBroP	
heksafluorofsfatas		
t-Butilas	tBu, But	
t-Butiloksikarbonilas	Boc	
Kavos rūgštis	Caff	
Karbonildiimidazolas	CDI	
Cisteinas	Cys	
5-chlorindol-2-karboksilas	CICA	
Cikloheksilas	Chx	
Cikloheksilalaninas	Cha	
Cikloheksilglicinas	Chg	
2,4-diaminobutano rūgštis	Dab	
Iš Dab gautas dimetilamidinis	Dab(N ^γ C ₃ H ₇ N)	
2,3-diaminopropano rūgštis	Dap	
Iš Dap gautas dimetilamidinis	Dap(N ^β -C ₃ H ₇ N)	
3,5-dinitrotirozinas	Tyr(3,5-NO ₂)	Y(3,5-NO ₂)
3,5-dijodtirozinas	Tyr(3,5-I)	Y(3,5-I)
3,5-dibromtirozinas	Tyr(3,5-Br)	Y(3,5-Br)
N,N-diizopropilkarboksamidas	DIBA	
N,N-diizopropilkarboksamidas	DIPA	
4-N,N-dimetilaminopiridinas	DMAP	
9-fluorenilmetiloksikarbonilas	Fmoc	
5-fluorindol-2-karboksilas	FICA	

Formilas	For	
Glutaminas	Gln	Q
Glutamino rūgštis	Glu	E
γ -karboksiglutamino rūgštis	Gla	
Glicinas	Gly	G
Histidinas	His	H
Homoargininas	hArg	hR
5-hidroksiindol-2-karboksilas	5-Hic	
N-hidroksibenzotriazolas	HOBt	
3-hidroksiprolinas	Hyp	
Iminodiactio rūgštis	Ida	
5-aminoindol-2-karboksilas	5AM2IN	
5-nitroindol-2-karboksilas	5NOINDC	
DL-indolin-2-karboksilas	2INCA	
Izobutilas	iBu	
Izoleucinas	Ile	I
Izonikotino rūgštis	Isn	
N-metil-izonikotino rūgštis	IsnMe	
4-piperidinkarboksirūgštis	Ina	
Izopropanolis	iPrOH	
1-izochinolinkarboksilas	1-Iqc	
3-izochinolinkarboksilas	3-Iqc	
Leucinas	Leu	L
tret-leucinas	Tle	
Lizinas	Lys	K
Merkapto- β,β -ciklopentametenpropano rūgštis	Mpp	
Merkaptoacto rūgštis	Mpa	
Merkaptopropano rūgštis	Mpr	
Metanolis	MeOH	
Metioninas	Met	M

4-morfolinkarbonilamidas	MORA	
N-metilmorfolinas	NMM	
1-naftilalaninas	Nal(1)	
2-naftilalaninas	Nal(2)	
Nikotino rūgštis	Nic	
3-piperidinkarboksirūgštis	Npa	
N-metilnikotino rūgštis	NicMe	
Norargininas	nArg	nR
Norleucinas	Nle	nL
Norvalinas	Nva	nV
Ornitas	Orn	
Iš ornitino gautas dimetilamidinis	Orn(N ^δ -C ₃ H ₇ N)	
Fenilas	Phe	
Fenilalaninas	Phe	F
p-guanidinofenilalaninas	Phe(Gua)	F(pGua)
p-aminofenilalaninas	Phe(NH ₂)	F(pNH ₂)
p-chlorfenilalaninas	Phe(Cl)	F(pCl)
p-fluorfenilalaninas	Phe(F)	F(pF)
p-nitrofenilalaninas	Phe(NO ₂)	F(pNO ₂)
p-hidroksifenilglicinas	Pgl(OH)	
p-toluensulfonilas	Tos	
2,2,5,7,8-pentametilchroman-6-sulfonilas	Pmc	
m-amidinofenilalaninas	mAph	
p-amidinofenilalaninas	pAph	
Fenilglicinas	Pgl	
Fenilmalono rūgštis	Pma	
Piperidinilas	PIP	
1-piperidinkarbonilamidas	PIPA	
L-pipekolino rūgštis	Pip	
Prolinas	Pro	P
2-pirazinkarboksilas	Pza	

2-chinolinkarboksilas	2-Qca	
4-chinolinkarboksilas	4-Qca	
Sarkozinas	Sar	
S-tret-butilas	SBut	
SCAL tiltelis, prijungtas prie "TENTAGEL"	SCAL-TG	
Serinas	Ser	S
Tetrahydroizochinolin-3-karboksilas	Tic	
Treoninas	Thr	T
Trifluoracetilas	Tfa	
Triptofanas	Trp	W
Tirozinas	Tyr	Y
3-jodtirozinas	Tyr(3-I)	Y(3-I)
O-metiltirozinas	Tyr(Me)	Y(Me)
Valinas	Val	V

* - D konfigūracijos aminorūgštys žymimos arba D-priešdėliu trijų raidžių kodo atveju (pvz., D-Ala, D-Cys, D-Asp, D-Trp), arba mažosiomis raidėmis, naudojant vienos raidės kodą (a, c, d, w, atitinkamai).

5

Terminas "Faktoriaus Xa aktyvumas", ta prasme kaip čia naudojamas, reiškia Faktoriaus Xa, paties vieno arba kartu su kitais protrombinazės komplekso nariais, sugebėjimą katalizuoti protrombino virtimą į trombiną. Terminas "inhibavimas", vartojamas sąryšyje su Faktoriaus Xa aktyvumu, apima tiek tiesioginį, tiek netiesioginį Faktoriaus Xa aktyvumo inhibavimą. Tiesioginis Faktoriaus Xa inhibavimas gali būti įgyvendintas, pavyzdžiui, surišant išradimo YIR peptidą su Faktoriumi Xa arba su protrombinaze tokiu būdu, kad būtų užkirstas kelias protrombinui susiristi su protrombinazės aktyviu centru. Netiesioginis Faktoriaus Xa aktyvumo inhibavimas gali būti

10

15

įgyvendintas, pavyzdžiui, surišant išradimo junginį su tirpiu Faktoriumi Xa, kad jis neišsijungtų į protrombinazės kompleksą.

Terminas “specifinis”, panaudotas sąryšyje su Faktoriaus Xa aktyvumo inhibavimu, čia reiškia, kad YIR peptidas gali inhibuoti Faktoriaus Xa aktyvumą, žymiau neinhibuodamas kitų nurodytų proteazių, įskaitant plazminą ir trombiną (naudojant tokias pačias inhibitoriaus koncentracijas). Tokios proteazės dalyvauja kraujo krešėjimo ir fibrinolizės kaskadoje (žiūr. 2 lentelę; taip pat žiūr. XXVII pavyzdį).

2 lentelė. Junginių inhibicinis aktyvumas penkių fermentų atžvilgiu

Junginys	K _i (μM)				
	Xa	Trom- binas	Plazmi- nas	Tripsi- nas	Elasta- zė
Ac-Y-I-R-L-A-A-F-T	1,5	100	NT	>200*	>100
Ac-Y-I-R-L-P	0,5	>200	>200	>200	>100
y-I-R-L-P	0,2	>200	>200	>200	>100
Ac-(iBu)Y-I-R-L-P	0,04	25	>200	NT	>100
“TENSTOP”	2	2	>200	NT	>200

* - esant aukštesnėms nurodyto junginio koncentracijoms žymesnis fermento aktyvumo inhibavimas nepasireiškė.

2 lentelės duomenys rodo, kad išradimo YIR peptidai yra naudingi Faktoriaus Xa inhibitoriai, bet žymiau neinhibuoja kitų serino proteazių, tokių kaip trombinas ar plazminas, kurios dalyvauja kraujo krešėjimo ir fibrinolizės procese, aktyvumo.

Čia naudojamas terminas “pakaitas” reiškia bet kurią iš įvairių cheminių grupių, kuri yra įvesta į čia aprašytų peptidų, peptidų analogų, panašių į juos junginių ar organinių junginių pagrindinę ar šoninę grandinę. Pakaitas gali apimti bet kurią iš eilės skirtingų struktūrų, žinomų tos srities specialistams (žiūr., pavyzdžiui, Giannis and Kolter, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32:1244-1247 (1993), kuris čia cituojamas). Aprašyme pateikti gausūs pavyzdžiai, iliustruojantys pakaitų įvedimą, pavyzdžiui, pakaito $p\text{-NH}_2$ įvedimas fenilalanine, siekiant gauti $F(p\text{NH}_2)$ ir halogeno įvedimas į tirozino molekulę, siekiant gauti, pavyzdžiui, Y(3-I) ar Y(3,5-I). Be to, pakaitas gali būti įvedamas per, pavyzdžiui, heteroatomą, tokį kaip azotas (N; žiūr., pavyzdžiui, Pal), deguonis (O; žiūr., pavyzdžiui, O-metiltiroziną) ar sierą (S; žiūr., pavyzdžiui, Tyr(SO₃H)). Taigi, N-, S- ar O- turinčios struktūros, tokios kaip -SO₃H, laikomos pakaitu kaip čia apibrėžta.

Terminas “alkilas” čia vartojamas plačiausia prasme ir reiškia sočias arba nesočias, linijines, šakotas ar ciklines grandines, turinčias 1-13 anglies atomų. Taigi, terminas “alkilas” apima, pavyzdžiui, metilą, etilą, n-propilą, izopropilą, antr.-butilą, 1-metilbutilą, 2,2-dimetilbutilą, 2-metilpentilą, 2,2-dimetilpropilą, n-pentilą ir n-heksilą, alkileno grupes, anglies atomų ciklines grandines, tokias kaip cikloheksilo ir ciklopentilo grupės, o taip pat linijinių ar šakotų ir ciklinių anglies atomų grandinių derinius, tokius kaip metilcikloheksilo ar ciklopropilmetileno grupes. Be to, reikia pripažinti, kad alkilas kaip čia apibrėžtas, gali būti su pakaitais. Panašiai, terminas “acilas” naudojamas plačiausia prasme ir reiškia sočias arba nesočias, linijines, šakotas ar ciklines grandines iš 1-13 anglies atomų, turinčias karboksilo grupę. Tokiu būdu, terminas “acilas” apima, pavyzdžiui tokias grupes kaip formilas, acetilas, benzoilas ir panašiai.

Terminas “arilas” reiškia aromatines grupes iš 5-13 anglies atomų ir turinčias mažiausiai vieną ciklinę grupę su konjuguota π elektronų sistema. Arilų pavyzdžiai apima, pavyzdžiui, heterociklines

arilo grupės, diarilo grupės ir jų analogus bei darinius, visi jie gali būti pasirinktinai pakeisti vienu ar keliais pakaitais. Terminas “arilalkilas” reiškia alkilą kaip apibrėžta aukščiau, pakeistą arilo grupe. Tinkamos arilalkilo grupės apima benzilą, pikolilą ir panašias grupes, visos jos gali būti pasirinktinai pakeistos.

Terminai “heteroalkilas”, “heteroarilalkilas” ir “heteroarilas” taip pat čia naudojami ir reiškia alkilą, arilalkilą ir arilą, atitinkamai, kuris yra pakeistas vienu ar keliais heteroatomais, tokiais kaip N, O ar S. Be to, terminas “heterociklinis” vartojamas apibūdinti ciklinei alkilo ar arilo grupei, kuri yra pakeista vienu ar keliais heteroatomais. Skaitlingi heteroalkilų, heteroarilalkilų, heteroarilų ir heterociklų pavyzdžiai atskleisti, pavydžiui, 1 ir 3 lentelėse, o kiti yra žinomi šioje srityje.

Išradimo peptidai gali būti modifikuoti N- arba C-gale, naudojant atitinkamai, aminogrupę arba karboksilą blokuojančias grupes. Čia atskleista daug tokių modifikacijų (žiūr., pavydžiui, 3 lentelę). Peptido ar peptido analogo N-galas gali būti chemiškai modifikuotas tokiu būdu, kad N-galinė aminogrupė būtų pakeista, pavydžiui, acetilo, ciklopentilkarboksilo, izochinolilkarboksilo, furoilo, tozilo, pirazinkarboksilo ar kita tokia grupe, kuri gali būti pakeista kaip aprašyta aukščiau. N-galinė aminogrupė taip pat gali būti pakeista, pavydžiui, sudarant atvirkščią amidinį ryšį. Reikia pripažinti, kad terminas “aminogrupė” čia plačiai vartojamas apibūdinti bet kuriai laisvai aminogrupei, įskaitant pirminę, antrinę ar tretinę aminogrupę, esančią peptide. Palyginimui, “N-galinė” reiškia peptido pirmos aminorūgšties α -aminogrupę, užrašytą įprastiniu būdu.

Išradimo peptido N-galas gali būti apsaugotas aminogrupę blokuojančia grupe. Terminas “aminogrupę blokuojanti grupė” čia plačiai vartojamas ir reiškia cheminę grupę, kuri gali reaguoti su laisva aminogrupe, įskaitant, pavydžiui, α -aminogrupę, esančią išradimo peptido N-gale. Reaguodama su ja, aminogrupę blokuojanti grupė apsaugo šiaip reakingą aminogrupę nuo nenaudingų reakcijų, kurios

gali vykti, pavyzdžiui, sintezės metu arba dėl egzopeptidazinio aktyvumo. Aminogrupės modifikavimas taip pat gali suteikti papildomų privalumų, įskaitant, pavyzdžiui, junginio tirpumo ar aktyvumo padidėjimą. Įvairios aminogrupę blokuojančios grupės, atskleistos čia (žiūr. 3 lentelę) ar žinomos šioje srityje apima, pavyzdžiui, acilo grupės, tokias kaip acetilo, pikoloilo, tret.-butilacetilo, tret.-butiloksikarbonilo, benziloksikarbonilo, benzoilo grupės, įskaitant, pavyzdžiui, benziloksimą, tokį kaip 2-aril-2-O-benziloksimą (žiūr. XVI pavyzdį), o taip pat aminoacilo liekaną, kuri pati gali būti modifikuota aminogrupę blokuojančia grupe. Kitos aminogrupę blokuojančios grupės aprašytos, pavyzdžiui, The Peptides, eds. Gross and Meienhofer, Vol. 3 (Academic Press, Inc., N.Y. 1981) ir Green ir Wuts knygoje Protective Groups in Organic Synthesis 2d ed., p. 309-405 (John Wiley & Sons, New York (1991)), abu šie šaltiniai čia cituojami. Peptido ar peptido analogo N-galinės amino grupės tokio modifikavimo produktas čia vadinamas “N-galo dariniu”.

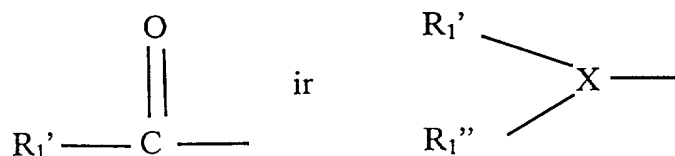
Panašiai, karboksigrupė, kaip peptido C-galo karboksigrupė, gali būti modifikuota naudojant karboksilą blokuojančią grupę. Terminai “karboksigrupė” ir “C-galas” vartojami panašia prasme kaip ir terminai “aminogrupė” bei “N-galas”, kas apibrėžta aukščiau. Karboksigrupė, tokia kaip esanti peptido C-gale, gali būti modifikuota, suredukuojant ją iki alkoholio arba aldehido arba sudarant esterį, arba pakeičiant ją tokiu pakaitu kaip tiazolilo, cikloheksilo ar kita grupė. Esteriai yra gerai žinomi šioje srityje ir apima, pavyzdžiui, alkoksimetilo grupės, tokias kaip metoksimetilas, etoksimetilas, izopropoksimetilas ir pan., 2-okso-1,3-dioksolen-4-ilmetilo grupės, tokias kaip 5-metil-2-okso-1,3-dioksolen-4-ilmetilas, 5-fenil-2-okso-1,3-dioksolen-4-ilmetilas ir pan.; C₁-C₃-alkiltiometilo grupės, tokias kaip metiltiometilą, etiltiometilą, izopropiltiometilą ir pan.; aciloksimetilo grupės, tokias kaip pivaloiloksimetilą, α-acetoksimetilą ir pan.; etoksikarbonil-1-metilo grupę; α-aciloksi-α-pakeistas metilo grupės, tokias kaip α-acetoksietilo,

3-ftalidilo ar 5,6-dimetilftalidilo grupės; 1-(C₁-C₄-alkoksikarboniloksi)et-1-ilo grupės, tokias kaip 1-(etoksikarboniloksi)et-1-ilo grupė; ir 1-(C₁-C₄-alkilaminokarboniloksi)et-1-ilo grupę, tokią kaip 1-(metilaminokarboniloksi)et-1-ilo grupę.

Išradimo peptidas gali būti modifikuotas prijungiant karboksilą blokuojančią grupę. Karboksilą blokuojančios grupės yra gerai žinomos ir apsaugo karboksigrupę nuo nenaudingų reakcijų (žiūr., pavyzdžiui, Greene ir Wuts, supra, p. 224-276 (1991)), kuris čia cituojamas. Patyręs specialistas pripažintų, kad toks modifikavimas kaip aprašyta aukščiau, kurį galima atlikti N-galinės arba C-galinės grupių atžvilgiu, gali būti įvykdytas su bet kuria peptide esančia amino- ar karboksigrupe, pavyzdžiui, šoninėje aminorūgšties arba aminorūgšties analogo, esančių išradimo peptide, grandinėje. Tokių modifikavimų metodikos atskleistos čia arba yra gerai žinomos specialistams.

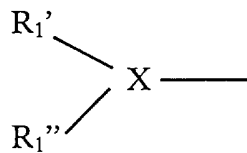
Išradimas pateikia junginius, specifiskai inhibuojančius Faktoriaus Xa aktyvumą. Išradimo junginys turi bendrą formulę X₁-YIR-X₂, arba tai yra jo funkcinis ekvivalentas, kur X₁ yra H, acilas, alkilas, arilalkilas, arba viena ar kelios aminorūgštys, X₂ yra modifikuota C-galinė grupė, viena ar kelios karboksilą blokuojančios grupės, arba arba viena ar kelios aminorūgštys arba kiti pakaitai, tokie kaip aminogrupę blokuojanti grupė. Išradimo junginys yra naudingas kaip antikoaguliacinis agentas terapiniam gydymui įvairiais klinikiniais atvejais. Išradimo junginys taip pat yra naudingas laboratoriniuose tyrimuose, padedant išvengti kraujo krešėjimo pavyzdžiuose.

Išradimas taip pat pateikia junginį, kuris specifiskai inhibuoja Faktoriaus Xa aktyvumą ir turi bendrą formulę A₁-A₂-(A₃)_m-B, kurioje m yra 0 arba 1 ir A₁ yra R₁-R₂-R₃, A₂ yra R₄-R₅-R₆ ir A₃ yra R₇-R₈-R₉; kur R₁ yra parinktas iš grupės, susidedančios iš 1-20 aminorūgščių;



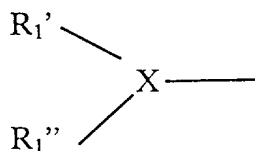
X yra parinktas iš grupės, susidedančios iš N, CH ir NC(O), ir
 5 R_1' ir R_1'' nepriklausomai vienas nuo kito yra parinktos iš grupės,
 susidedančios iš H, alkilo, acilo, arilo, arilalkilo ir aminogrupę
 blokuojančios grupės, ir kurioje R_1 gali būti pakeistas pakaitu; R_2 yra -
 $\text{CR}_{99}\text{R}_{100}$ -, kur R_{99} ir R_{100} nepriklausomai vienas nuo kito yra parinkti
 iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, arilalkilo, heteroarilalkilo ir
 10 heteroarilo, ir kur R_{99} ir R_{100} nepriklausomai gali būti pakeisti; R_3 yra
 parinktas iš grupės, susidedančios iš -C(O)-, -CH₂-, -CHR₉₉-C(O)- ir -
 C(O)-NR₃₅-CH₂-C(O)-, kurioje R_{35} yra CHR₅₅ grupė, priklausanti
 tilteliui -C(O)-CR₅₅-; R_4 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš -CH₂-
 ir -NR₅₀-, kurioje R_{50} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo,
 15 arilalkilo ir heterociklo; R_5 yra >CR₂₀₁R₂₀₂, kurioje R_{201} ir R_{202}
 nepriklausomai yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, arilo,
 ir arilalkilo, ir kurioje R_{201} ir R_{202} nepriklausomai gali būti pakeisti; R_6
 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš -C(O)-, -CH₂- ir -CHR₉₉-
 C(O)-; R_7 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš -CH₂- ir NR₅₁-, kur
 20 R_{51} yra H, alkilas, arilalkilas, heteroalkilas ir heteroarilalkilas ir bet kuri
 iš šių grupių turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš Q ir -
 (CH₂)_n-Q, kur n yra nuo 1 iki 5 ir Q yra parinktas iš grupės,
 susidedančios iš amino, amidino, imidazolo ir guanidino grupių, kurios
 gali būti pakeistos, ir jų farmaciškai priimtinos mono-, di-, tri- ar tetra-
 25 amonio druskos, izoureidai ar izotioureidai; R_8 yra -CR₂₁₀R₂₁₁-, kurioje
 R_{210} ir R_{211} nepriklausomai vienas nuo kito yra parinkti iš grupės,
 susidedančios iš H, alkilo, alkilarilo ir heterociklo, o bet kuris iš jų turi
 pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš Q ir -(CH₂)_n-Q, kur n yra
 nuo 1 iki 5 ir Q yra parinktas iš grupės, susidedančios iš amino, amidino,
 30 imidazolo ir guanidino grupių, kurios gali turėti pakaitą, ir jų
 farmaciškai priimtinių mono-, di-, tri- ir tetra-amonio druskų, izoureidų

ar izotioureidų; R_9 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš $-C(O)-$, $-CH_2-$ ir $-CHR_{99}-C(O)-$; ir kurioje, kai m yra 1, B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš 1-20 aminorūgščių, $-NHR_{52}$, $-NR_{60}R_{61}$, $-OR_{70}$ ir $-CHR_{60}R_{61}$, kurioje R_{52} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, arilalkilo, heteroarilalkilo ir heteroarilo; kurioje R_{60} ir R_{61} nepriklausomai vienas nuo kito yra parinkti iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, arilalkilo, arilo, heteroarilalkilo ir heteroarilo, ir kurioje R_{70} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, acilo, alkilo, arilalkilo ir heteroarilalkilo, ir kurioje, kai m yra 0, B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš 1-20 aminorūgščių, $-OR_{70}$, $-NHR_{52}$ ir $-NR_{60}R_{61}$, kurie yra prijungti prie R_6 amidiniu arba esteriniu ryšiu; kurioje B gali būti pakeistas, su sąlyga, kad, kai R_3 yra $-CH_2-$ ar $-CHR_{99}-C(O)-$, R_4 yra NR_{50} ; kai R_4 yra $-CH_2-$, R_3 yra $-C(O)-$ arba $-CHR_{99}-C(O)-$; kai R_6 yra $-CH_2-$, R_7 yra $-NHR_{51}-$; kai R_7 yra CH_2 , R_6 yra $-C(O)-$ arba $-CHR_{99}-C(O)-$; kai R_4 yra $-NR_{50}-$ ir R_1 yra



R_{35} ir R_1' paimti kartu, sudaro formulės $-C(O)CHR_{55}-$ tiltelį, kuriame R_1' reiškia $C(O)$ ir R_{35} reiškia CHR_{55} ; R_1'' ir R_{55} nepriklausomai yra H arba C_1-C_6 alkilas (žiūr., pavyzdžiui, Fig.2).

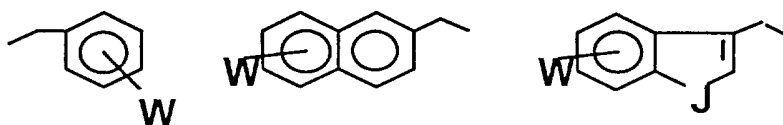
Išradimo junginys gali turėti ciklinį N-galą, suformuotą R_1 , R_2 , R_3 ir, jei naudinga R_4 . Toks junginys yra aprašomas, pavyzdžiui, formule $A1-A2-(A3)_m-B$, kaip aprašyta aukščiau, kurioje R_4 yra $-NR_{50}-$, R_1 yra



R_{50} ir R_1' , paimti kartu, sudaro formulės $-C(O)-CHR_{55}$ tiltelį, kuriame R_{55} yra H; R_1 yra H arba metilas; R_{99} ir R_{100} nepriklausomai yra parinkti iš grupės, susidedančios iš H, arilalkilo, alkilo ir heteroalkilo, arba nuo 1 iki 3 anglies atomų, ir kurioje R_{99} ir R_{100} savo ruožtu gali būti prijungti prie struktūrinio

vieneto, parinkto iš iš grupės, susidedančios iš fenilo, tienilo, tiazolilo, piridilo, naftilo, tionaftilo, indolilo arba sotaus alkilo, alkoksilo, monoalkilamino, dialkilamino, tetraalkilamonio, arilalkilamino, aminoalkilarilo, karboksilo, halogeno, hidroksilo, amino, amido, amidino, guanidino, triazolilo ir sulfonilo, ir R_3 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš $-C(O)-$ ir $-C(O)-NR_{35}-CH_2-C(O)-$.

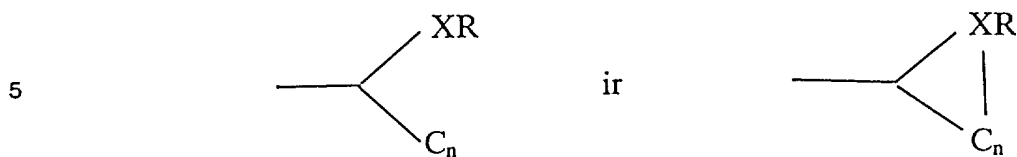
Be to, junginyje $A1-A2-(A3)_m-B$ grupės R'_1 ir R''_1 gali turėti iki šešių pakaitų, įskaitant, pavyzdžiui, alkilą, ir gali būti pasirinktinai sujungtos grupė, tokia kaip $-OCH_2-$, $-SCH_2-$, $>N-CH_2-$, $>NC(O)-$, $-CO-$ arba $-NY-CO-NZ$, kur Y ir Z gali būti H, alkilas, arilalkilas arba heteroalkilarilas. Be to, R_{99} ir R_{100} nepriklausomai gali turėti pakaitą, tokį kaip fenilas, tienilas, tiazolilas, piridilas, naftilas, tionaftilas arba indolilo grupė, arba jas atitinkanti soti grupė, pasirinktinai turinčios iki penkių pakaitų, parinktų iš alkilo, alkoksilo, mono-, di- arba trialkilamino, tetraalkilamonio, arilalkilamino, aminoalkilarilo, karboksilo, halogenų, hidroksilo, amino, amido, amidino, guanidino, triazolilo arba sulfonilo. Pirmenybė teikiama junginiui su pakaitais R_2 vietoje, kuriame R_{100} yra H ir R_{99} yra bet kuris iš



kur W pakeistame junginyje gali būti, pavyzdžiui, halogenas, hidroksilas, amino arba amidino grupė, ir J gali būti, pavyzdžiui, O, S arba $-NR$, kur R yra H arba alkilas, arilas arba arilalkilas.

Išradimo junginys, kuris turi pakaitą $A2$ struktūriniame vienete ir pasireiškia kaip Faktoriaus Xa aktyvumo inhibitorius, gali turėti, pavyzdžiui, pakaitus grupėse R_{50} , R_{201} ar R_{202} su vienu arba keliais

heteroatomais, tokiais kaip N, O arba S. R₂₀₂ taip pat gali turėti pakaitą, parinktą iš



kur X yra C, N arba S; R nėra arba jis yra H arba alkilas, kuris gali būti pakeistas heteroatomu, ir n yra 1-5.

10 Išradimo junginys, kuris turi pakaitą A3 struktūriniame vienete ir pasireiškia kaip Faktoriaus Xa inhibitorius, gali būti, pavyzdžiui pakeistas grupėje R₅₁ vienu ar daugiau pakaitų, tokių kaip H, alkilas, arilalkilas arba heterociklas, pasirinktinai pakeistas heteroatomu, tokiu kaip N, O arba S. Grupėse R₂₁₀ ir R₂₁₁ gali būti, pavyzdžiui, pakaitas -

15 (CH₂)_n-Q, kuriame n yra 1-5 ir Q yra amino, amidino, urėjos, imidazolo, guanidino, mono-, di-, tri- arba tetra-alkiliminio farmaciškai priimtina druska, izoureidas arba izotioureidas. Arba R₂₁₀ ar R₂₁₁ gali būti, pavyzdžiui, alkilas, arilas arba alkilarilas. Šios grupės savo ruožtu gali būti pakeistos tokiais pakaitais, kaip hidroksilas arba C₁-C₄-

20 alkoksilas.

Išradimo junginys gali turėti alternatyvų pakaitų išdėstymą, apimantį B struktūrinį vienetą. Toks alternatyvus pakaitų išdėstymas gali apimti, pavyzdžiui, R₅₂ pakeitimą N, O arba S arba R₆₀, R₆₁ ar R₇₀ pakeitimą vienu arba keliais heteroatomais arba alkilo grupėmis.

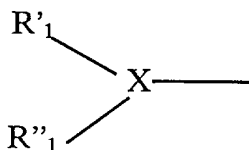
25 Čia atskleistos bendros formulės atspindi įvairius išradimo junginius, kurie išlaiko Faktorių Xa inhibuojantį aktyvumą, kaip pademonstruota tripeptidu YIR. Taip pat čia atskleistos struktūros atspindi junginius, turinčius negamtines aminorūgštis, panašius į aminorūgštis ir kitus organinius junginius bei pakaitus, turinčius panašią

30 funkciją. Tokie funkciniai ekvivalentai suteikia tinkamą erdvinį norimų

Būdingi išradimo junginių pavyzdžiai apima, pavyzdžiui, Ac-Tyr-Ile-Arg-Leu-Ala-NH₂; Ac-Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-(iBu)Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-Tyr-Ile-Arg-N(CH₃)O(CH₃); Ac-Tyr- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-Tyr-Ile-Arg-NH-CH₂(4-piridil); Ac-Tyr-Ile- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-Tyr-Chg-Arg(NO₂)- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Leu-NH₂; Ac-Tyr-Ile-Arg- $\{\Psi(\text{COCH}_2)\}$ -Gly-Pro-NH₂; Ac-Tyr-Ile-Dab(N⁷-C₃H₇N)-Leu-Ala-NH₂; Ac-Tyr-Ile-PalMe(3)-NH₂; Tyr-Ile-Arg-NH₂; D-Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-(Bzl)Gly-(Chx)Gly-(3-guanidopropil)Gly-NH₂; ciklo(Gly-Tyr-Ile-Arg-Gly); Tfa-(iBu)Tyr-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂; Ac-pAph-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂; ir Ac-Nal(2)-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂. Daugiau išradimo peptidų YIR yra pateikta, pavyzdžiui, 3 ir 5 lentelėse.

Išradime taip pat pateikiamas junginys, kurio bendra formulė A1-A2-(A3)_m-B, kurioje R₁ yra

15



20

25

30

R'₁ yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, -CO-R_a, -SO₂-R_a, aminogrupę blokuojančios grupės, 1-6 aminorūgščių, kurios gali būti pakeistos, kur minėtų 1-6 aminorūgščių N-galas turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš H, -CO-R_a ir aminogrupę blokuojančios grupės; ir R_a yra parinktas iš grupės, susidedančios iš alkilo, arilo ir heteroalkilo; R''₁ yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, acilo ir alkilo; X yra N; R₂ yra -CHR₉₉-, kur R₉₉ yra parinktas iš grupės, susidedančios iš alkilo, arilo, arilalkilo, heteroalkilo ir heteroarilo, kurie gali turėti pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš 1-6 fluoro, chloro, bromo, jodo atomų, amino, nitro, amidino, amido, karboksilo, esterio, eterio ir hidroksilo grupių; R₃ yra -C(O)-; R₄ yra -NH-; R₅ yra -CHR₂₀₁-, kur R₂₀₁ yra alkilas; R₆ yra -C(O)-; R₇ yra -NH-; R₈ yra -CHR₂₁₀-, kur R₂₁₀ yra heteroalkilas, turintis bent vieną formaliai teigiamą krūvį, kur heteroatomas yra 1-6 azoto atomai; R₉ yra -C(O)-; ir

CHR₂₁₀-, kur R₂₁₀ yra heteroalkilas, turintis bent vieną formaliai teigiamą krūvį, kur heteroatomas yra 1-6 azoto atomai; R₉ yra -C(O)-; ir B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš -OR_b ir -N-R_cR_d, kur R_b yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo ir karboksilą blokuojančios grupės, R_c yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H ir alkilo, R_d yra parinktas iš grupės, susidedančios iš alkilo, heteroalkilo ir 1-20 aminorūgščių, kurie gali turėti pakaitą, kur minimo junginio C-galas gali būti modifikuotas karboksilą blokuojančia grupe, pirminio amido grupe arba dalimi ciklinio peptido, turinčia pavidalą antrinės arba tretinės amido grupės, sudarytos su R₁ aminogrupe. Toks junginys gali turėti vieną arba kelias aminogrupę blokuojančias grupes.

Pavyzdžiui, išradimo junginyje A1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Tyr, F(pNH₂), mAph, pAph ir Nal(2), kurie turi 0-1 aminogrupę blokuojančią grupę; A2 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Ile ir Chg; A3 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Arg, Pal(Me), Dab(N^γ-C₃H₇N), Dap(N^β-C₃H₇N) ir Orn(N^δ-C₃H₇N); ir B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš -H, -OH, -NH₂, 1-5 aminorūgščių arba jų funkcinų ekvivalentų ir karboksilą blokuojančios grupės. Tokių junginių pavyzdžiai apima Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-CH₂-Chx; Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-Chx; Bzf-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂; Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-L-P-NH₂; Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂; ciklopentil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂; 3-Iqc-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂; 2-furoil-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂; 5-Me-tienil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂; ir Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-olis (taip pat žiūr. 5 lentelę).

Išradimas dar pateikia junginį, turintį bendrą formulę A1-A2-B, t.y., A1-A2-(A3)_m-B, kur m yra 0. Tokiame junginyje B gali būti heteroarilalkilas toks kaip (4-(N-metilpiridinium))metilas; 2-(3-(N-metilpiridinium))et-1-ilas; 1-(4-(N-metilpiridinium))et-1-ilas; (p-amidino)benzilas; 2-(4-(N-metilpiridinium))prop-2-ilas; ir 2-(4-(N-metilpiridinium))et-1-ilas. Tokių junginių pavyzdžiai yra Ac-pAph-Chg-AMP(4) ir Ac-pAph-Chg-AEMP(4).

L- ar D-aminorūgščių įjungimas į šio išradimo junginį gali dalinai priklausyti nuo to, kokias peptido charakteristikas norime turėti. Pavyzdžiui, vienos ar kelių D-aminorūgščių įjungimas gali junginiui suteikti didesnę stabilumą *in vitro* ar *in vivo*. Vienos ar kelių D-aminorūgščių įjungimas taip pat gali padidinti arba sumažinti junginio farmakologinį aktyvumą. Kai kuriais atvejais gali būti naudinga leisti junginiui būti aktyviu tik trumpą laiką. Tokiais atvejais vienos ar kelių L-aminorūgščių įjungimas į junginį gali leisti endogeninėms individo peptidazėms suskaidyti junginį *in vivo*, tokiu būdu apribojant individo kontaktą su aktyviu junginiu. Šios srities specialistas gali nustatyti norimas išradimo junginio charakteristikas, atsižvelgiant į individo amžių ir bendrą sveikatos būklę.

Išradimo junginys gali būti susintetintas panaudojant, pavyzdžiui, automatinį sintezatorių (žiūr. 1 pavyzdį). Selektyvus reakingos grupės, tokios kaip peptido aminorūgšties šoninėje grandinėje esančios arba N- ar C-galinės grupės, modifikavimas gali suteikti išradimo junginiui pageidaujamas charakteristikas, tokias kaip didesnis tirpumas ar stipresnis inhibuojantis veikimas.

Kai naudojami sintezės kietoje fazėje metodai, junginio cheminė sandara gali būti keičiama, kol susidarantis peptidas yra prijungtas prie dervos, arba po to, kai peptidas atskeliamas nuo dervos, gaunant, pavyzdžiui, N-galo darinį, tokį kaip N-acetilintas darinys. Panašus modifikavimas gali būti atliekamas junginio karboksigrupės atžvilgiu, įskaitant C-galo karboksigrupę, kuri, pavyzdžiui, gali būti amidinama. Šios srities specialistas gali susintetinti išradimo YIR peptidą, naudodamas sintezę skystoje fazėje. Susintetintas junginys gali būti išvalytas naudojant gerai žinomus būdus, tokius kaip atvirkščių fazių didelio efektyvumo skysčių chromatografiją (RP-HPLC; žiūr. 1 pavyzdį) ar kitais atskyrimo būdais, pagrįstais, pavyzdžiui, junginio dydžiu, krūviu ar hidrofobiškumu. Panašiai, gerai žinomi metodai, tokie kaip aminorūgščių sekos analizė ar masių spektrometrija (MS) gali būti

naudojami išradimo junginio struktūros charakterizavimui (žiūr. 1 pavyzdį).

Išradimo YIR peptidai gali būti linijiniai arba cikliniai (žiūr., pavyzdžiui, 3 lentelę). Ciklizacija gali būti įgyvendinta sudarant tiltelį tarp dviejų negretimų liekanų, struktūrinių vienetų ar pakaitų, kurie gali 5 įeiti į YIR motyvą arba būti už jo ribų. Ciklizacija taip pat gali būti įvykdyta, pavyzdžiui sudarant tiltelį tarp vienos iš YIR motyvo liekanų ir negretimos liekanos, struktūrinio vieneto ar pakaito, esančių už YIR sekos ribų. Pavyzdžiui, peptidai ar į peptidus panašūs junginiai gali būti ciklinami per S-S, -CH₂-S-, -CH₂-O-CH₂-, laktamo ar esterio ryšius arba 10 kaip aprašyta anksčiau (žiūr. Hrubby, Life Sci. 31:189-199 (1982); Toniolo, *Int. J. Pept. Prot. Res.* 35:287-300 (1990); Kates et al., *Tetr. Lett.* 34:1549-1552 (1993), kiekvienas iš jų čia cituojamas).

Frazė “už YIR motyvo ribų” čia vartojama ta prasme, kad neapimama YIR sekos tirozino, izoleicino ar arginino liekana ar jos 15 ekvivalentas, esantis išradimo YIR peptide. Priešingai, frazė “YIR motyvo viduje” reiškia, kad apimama bent viena iš YIR peptido tirozino, izoleicino ar arginino liekanų ar jos ekvivalentas. Terminas “tiltelis”, kalbant apie ciklinį junginį, reiškia ryšį tarp dviejų negretimų išradimo YIR peptido aminorūgščių. 20

Ciklizacija gali būti įgyvendinta sudarant, pavyzdžiui, disulfidinį arba laktaminį ryšį tarp X₁ ir X₂. Liekanos, galinčios sudaryti disulfidinį tiltelį, yra, pavyzdžiui, Cys, Pen, Mpr ir Mpp ir jos 2-aminogrupę turintys ekvivalentai. Liekanos, galinčios sudaryti laktaminį tiltelį, yra, 25 pavyzdžiui, Asp, Glu, Lys, Orn, α,β-diaminopropano rūgštis, α-adipino rūgštis, α,γ-diaminobutano rūgštis, diaminoacto rūgštis, aminobenzoinė rūgštis ir merkaptobenzoinė rūgštis. Čia atskleisti junginiai gali būti ciklinami, pavyzdžiui, per laktaminį ryšį, kurio susidaryme gali dalyvauti negretimos liekanos šoninės grandinės grupė, sudarant kovalentinį ryšį su X₁ ar Y N-galo aminogrupe. Alternatyvios jungiančios struktūros 30 taip pat gali būti panaudotos išradimo junginių ciklinimui, įskaitant,

pavyzdžiui, peptidus ir į juos panašius junginius, kurie gali būti ciklinami per S-S, -CH₂-S-, -CH₂-S-, -CH₂-O-CH₂-, laktaminį, esterinį ar kitokią ryšį (žiūr., pavyzdžiui, Hrubby, supra, 1982; Toniolo, supra, 1990; Kates et al., supra, 1993).

5 Kompozicija pagal šį išradimą gali būti pateikta kaip homogeninė kompozicija arba kaip junginių, turinčių įvairius pakaitų derinius, mišinys. Pakaitų platus pasirinkimas atveria plačias galimybes keisti peptidinio junginio analogų fizikines chemines savybes. Pakaito pasirinkimas taip pat įtakoja junginio cheminį giminingumą (žiūr. 10 pavyzdžius).

Įvairūs junginiai, turintys skirtingus pakaitų derinius, turi nevienodą inhibicinį aktyvumą Faktoriaus Xa atžvilgiu. Šie junginiai susintetinti pagal metodikas, aprašytas pavyzdžiuose. Peptidų inhibicinis aktyvumas ištirtas naudojant tyrimo metodikas, aprašytas XXXVII ir 15 XXXVIII pavyzdžiuose. Pasinaudodamas tokiomis metodikomis šios srities specialistas gali susintetinti čia atskleistą junginį, įskaitant jo modifikacijas, ir nustatyti jo inhibicinį aktyvumą Faktoriaus Xa atžvilgiu.

Išradimas aprašo junginius, kurie specifiškai inhibuoja 20 Faktoriaus Xa aktyvumą. Tokie junginiai turi $K_i \leq 100 \mu\text{M}$, geriausia, $\leq 2 \text{ nM}$ Faktoriaus Xa atžvilgiu ir iš esmės neinhibuoja kitų proteazių, dalyvaujančių koaguliacijos ir fibrinolizės procese (žiūr. 2 lentelę aukščiau). Tokios kitos proteazės apima, pavyzdžiui, trombiną ir plazminą. Išradimo junginių specifiškumas demonstruojamas toliau 25 XXXVII pavyzdžiu (taip pat žiūr. 2 lentelę, aukščiau).

Išradimo junginys gali būti sėkmingai naudojamas kaip antikoaguliantas, kuris sąlytyje su kraujo mėginiu sustabdo krešėjimą. Pavyzdžiui, išradimo junginio efektyvus kiekis gali būti įdėtas į šviežiai 30 paimto kraujo mėginį, kad sustabdytų krešėjimą. Terminas "efektyvus kiekis", panaudotas kalbant apie išradimo junginį, čia reiškia junginio kiekį, kuris inhibuoja Faktoriaus Xa aktyvumą. Šios srities specialistas

pripažintų, kad efektyvus išradimo junginio kiekis gali būti nustatytas, naudojant čia atskleistus (žiūr. XXXVII ir XXXVIII pavyzdžius) arba kitus šioje srityje gerai žinomus metodus. Ryšium su atskleistu akivaizdžiu išradimo junginio naudingumu šios srities specialistas taip pat turėtų pripažinti, kad heparinas gali būti pakeistas išradimo junginiu. Toks išradimo junginio panaudojimas gali sąlygoti, pavyzdžiui, mažesnę kainą, lyginant su kitais antikoaguliantais.

Be to, išradimo junginys gali būti skiriamas įvairių individo klinikinių būsenų gydymui, įskaitant, pavyzdžiui, širdies kraujagyslių susirgimus arba komplikacijas, susijusias su infekcija ar chirurgine intervencija. Širdies kraujagyslių sutrikimai apima restenozę po plastinės kraujo indų operacijos, suaugusiųjų kvėpavimo sutrikimo sindromą, daugybinių organų sutrikimą, ūmų ir išplitusį intravaskulinį krešėjimo sutrikimą. Susirgimų, susijusių su chirurgine intervencija, atvejai apima, pavyzdžiui, giliųjų ir vidinių venų trombozę, kuri gali atsirasti po operacijos. Taigi, išradimo junginys yra naudingas kaip medikamentas, skirtas nepageidaujamo krešėjimo individe sumažinimui ar inhibavimui.

Kadangi išradimo YIR peptidas gali inhibuoti Faktoriaus Xa aktyvumą, toks junginys gali būti naudingas sumažinant ar inhibuojant kraujo krešėjimą individe. Terminas "individas" čia reiškia stuburinę gyvūną, įskaitant žinduolį, tokį kaip žmogus, kuriuose Faktorius Xa yra įjungtas į krešėjimo kaskadą.

Kraujo krešėjimas individe gali būti sumažintas ar inhibuotas paskiriant individui terapiškai efektyvų išradimo peptido YIR kiekį. Terminas "terapiškai efektyvus kiekis" reiškia YIR peptido dozę, kuri turi būti paskirta individui, siekiant inhibuoti Faktoriaus Xa aktyvumą individe. Konkrečiau, terapiškai efektyvus išradimo junginio kiekis inhibuoja Faktoriaus Xa katalitinį aktyvumą arba tiesiogiai, jam esant protrombinazės komplekso viduje arba tirpaus subvieneto pavidale, arba netiesiogiai, inhibuodamas Faktoriaus Xa įsijungimą į

protrombinazės kompleksą. Ypač Faktoriaus Xa aktyvumą inhibuoja junginiai su $K_i \leq 100 \mu\text{M}$, o geriausia, su $K_i \leq 2 \text{ nM}$. Terapiškai efektyvus kiekis gali būti nustatytas naudojant aprašytus, pavyzdžiui, XXXVII ir XXXVIII pavyzdžiuose arba kitus žinomus šioje srityje metodus.

Taikant gydymo būdą pagal išradimą praktikoje konkreti dozė, turinti terapiškai efektyvų farmacinės kompozicijos kiekį, skiriamą individui, priklausys nuo įvairių veiksnių, įskaitant, pavyzdžiui, ligos pobūdį ar stiprumą, paskyrimų planą ir individo amžių bei fizinę būklę. Tinkamos dozės gali būti nustatytos, panaudojant klinikinius būdus, gerai žinomus medicinoje. Taigi, išradimas pateikia Faktoriaus Xa aktyvumo specifinio inhibavimo būdą, jam kontaktuojant su junginiu, turinčiu formulę $X_1\text{-YIR-X}_2$ arba $A1\text{-A2-(A3)}_m\text{-B}$, kur m yra 0 arba 1, arba su jo funkciniu ekvivalentu. Be to, išradimas pateikia kraujo krešėjimo sumažinimo arba inhibavimo individe būdą, skiriant terapiškai efektyvų išradimo junginio kiekį.

Individui išradimo junginys pagrindinai bus skiriamas kompozicijos, turinčios junginį ir farmaciškai priimtina nešiklį, pavidale. Terminas "farmaciškai priimtinas nešiklis" reiškia terpę arba kompoziciją, kuri yra netoksiška individui arba jos toksiškumas yra priimtinas, kas yra nustatyta atitinkamos reguliuojančios įstaigos. Čia vartojamas terminas "farmaciškai priimtinas nešiklis" apima bet kurią standartinę farmacinę nešiklį, tokį kaip fosfatinis buferinis tirpalas, vanduo, emulsija, tokia kaip aliejaus vandenyje arba vandens aliejuje emulsija, ar bet kuris iš įvairių tipų drėkinančių agentų. Tinkami farmaciniai nešikliai ir jų kompozicijos aprašyti Martin (Remington's pharmaceutical Sciences, 15th Ed. (Mack Publishing Co., Easton 1975), kuris čia cituojamas). Tokios kompozicijos paprastai turės išradimo junginio efektyvų kiekį kartu su tinkamu nešiklio kiekiu tokiu būdu, kad būtų tinkama skyrimui dozė. Taigi, pareikšti junginiai gali būti naudingi

kaip medikamentai, skirti Faktoriaus Xa aktyvumo ir kraujo krešėjimo inhibavimui individe.

5 Farmaciškai priimtini nešikliai taip pat gali apimti, pavyzdžiui, kitas Faktoriaus Xa aktyvumą inhibuojančio junginio terpes, junginius ar modifikacijas, kurie sustiprina jo farmakologines funkcijas. Farmaciškai priimtina terpė gali apimti pavyzdžiui, rūgščių druskas, tokias kaip druskos, sudarytos su neorganinėmis rūgštimis, tokiomis kaip vandenilio chlorido rūgštis, vandenilio bromido rūgštis, fosforo rūgštis, sieros rūgštis ar perchlorato rūgštis, arba su organinėmis rūgštimis, tokiomis kaip acto rūgštis, oksalo rūgštis, maleino rūgštis, 10 obuolių rūgštis, vyno rūgštis, citrinų rūgštis, gintaro rūgštis ar malono rūgštis. Kitos farmaciškai priimtinos druskos apima, pavyzdžiui, neorganinius nitratus, sulfatus, acetatus, malatus, formiatų, laktatus, tartratus, sukcinatus, citratus, p-toluensulfonatus ir pan., įskaitant, bet neapsiribojant, šarminių ir žemės šarminių metalų katijonus, tokius kaip 15 natrio, ličio, kalio, kalcio ar magnio, taip pat netoksinius amonio, ketvirtinio amonio ir amino katijonus, tokius kaip amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, tetrametilamonio, etilamonio, trietilamonio ir tetraetilamonio katijonus.

20 Modifikacijos, kurios sustiprina junginio farmacinę funkciją, apima, pavyzdžiui, esterinimą, tokį kaip C₁-C₆-alkilo esterių, geriausia C₁-C₄-alkilo esterių, kuriuose alkilo grupė yra linijinė ar šakota grandinė, susidarymą. Kiti priimtini esteriai yra, pavyzdžiui, C₅-C₇-cikloalkilo esteriai ir arilalkilo esteriai, tokie kaip benzilo esteriai. Tokie 25 esteriai gali būti susintetinti iš čia aprašytų junginių, naudojant įprastines metodikas, gerai žinomas peptidų chemijoje.

Farmaciškai priimtinos modifikacijos gali taip pat apimti, pavyzdžiui, peptido amidų susidarymą. Tokios modifikacijos iki amido, kurios gali būti atliktos su išradimo junginiais apima, pavyzdžiui, 30 amonio, pirminių C₁-C₆-dialkilaminų, kuriuose alkilo grupė yra tiesi ar šakota grandinė, arba arilaminų su įvairiais pakaitais panaudojimą.

Antrinių aminų atveju aminos taip pat gali būti 5-nario ar 6-nario heterociklo, turinčio, pavyzdžiui, azoto atomą, formoje. Tokių amidų sintezės būdai yra gerai žinomi.

5 Kitame išradimo įgyvendinime YIR peptidas gali būti panaudojamas nustatant Faktoriaus Xa buvimą arba išskiriant Faktorių Xa iš esmės gryname pavidale. Pageidautina, kad išradimo junginys būtų pažymėtas, pavyzdžiui, radioizotopu, o žymėtas junginys nustatomas įprastais metodais, būdingais konkrečiai žymei. Be to, YIR peptidas gali būti sėkmingai naudojamas Faktoriaus Xa buvimo vietai ar
10 aktyvumui nustatyti *in vivo*, *in vitro* ar *ex vivo*.

Suprantama, kad modifikacijos, kurios žymiai neveikia įvairių išradimo įgyvendinimo atvejų, yra įtrauktos į čia atskleistą išradimą. Atitinkamai, pateikti žemiau pavyzdžiai tik iliustruoja išradimą, bet jo neapriboja.

15

I PAVYZDYS

Peptidų sintezės metodikos

Sintezėje naudojamos pradinės medžiagos gautos iš chemikalais
20 prekiaujančių firmų, tokių kaip Aldrich, Sigma, Fluka, Nova Biochem ir Advance Chemtech. Šių junginių sintezės metu aminorūgščių darinių funkcinės grupės buvo apsaugotos blokuojančiomis grupėmis, siekiant apsaugoti nuo pašalinių reakcijų. Tinkamų blokuojančių grupių pavyzdžiai ir jų panaudojimas aprašyti The Peptides, supra, 1981, ir
25 Vol. 9, Udenfriend and Meienhofer ed. 1987, kurie čia cituojami.

Išradimo junginiams gauti buvo naudojama peptidų sintezė kietoje fazėje. Tokie metodai aprašyti, pavyzdžiui, Stewart ir Young (Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman and Co., San Francisco, 1969), kuris čia cituojamas).

30

Jei kitaip nepamėta, peptidai buvo sintetinami ant polistireno dervos, susiūtos 1 % divinilbenzenu. Rūgščiai jautrus tiltelis (Rink

Linker) buvo prijungtas prie kieto pagrindo (Rink, Tetr. Lett. 28:3787 (1987); Sieber, Tetr. Lett. 28:2107 (1987), abu šaltiniai čia cituojami). Prijungimas įvykdytas naudojant N,N'-diizopropilkarbodiimidą (DIC) dalyvaujant ekvivalentiniam kiekiui HOBt. Visos prijungimo reakcijos vykdytos arba N,N-dimetilformamide (DMF) arba DMF ir dichlormetano mišinyje (1:1) kambario temperatūroje (RT) 40 min. Prijungimo reakcijos pabaiga nustatoma ninhidrino testu.

Fmoc grupės deblokavimas įvykdytas panaudojant 50% piperidiną DMF, per 10 min. Išsiskyrusio Fmoc kiekis nustatytas pagal tirpalo absorbciją ties 300 nm pasibaigus deblokavimui, praplovimo tirpalų turį ir panaudotos dervos svorį. Prijungimas vykdomas antrą kartą, jei pirmą kartą jis nepilnai įvyko. Prijungimo reakcijos ciklas ir metodikos yra tokios:

Eil. Nr.	Operacija	Reagentai ir tirpikliai
1.	1 g peptido dervos	10 ml DMF
2.	2,4-kartinis aminorūgšties darinio perteklius	
3.	2,4 ekvivalentas	DIC
4.	2,4 ekvivalentas	HOBt
5.	Prijungimas 40 min.	
6.	Praplovimas (3x8 ml)	
7.	Ninhidrino testas	
8.	Deblokavimas (10 min.)	8 ml 50% piperidinas/DMF
9.	Praplovimas (6x8 ml)	DMF
10.	Praplovimas (2x8 ml)	Dichlormetanas (DCM)
11.	Ninhidrino testas	
12.	Pakartoti pradedant operacija Nr.2	

Užbaigus peptido pririšimą ant dervos, atliekamas galutinis Fmoc deblokavimas, kurį seka įprastiniai praplovimo ciklai ir nustatomas deblokavimo metu išsiskyrusios Fmoc grupės kiekis. Kai kuriais atvejais $N\alpha$ -neapsaugotas peptidas acetilinamas, purtant peptidinę dervą 15 min. su 20-kartiniu acto rūgšties anhidrido/piridino (1:1) tirpalo DMC pertekliumi. Peptidinė derva perplaunama iš eilės DCM, DMF ir DCM, po to išdžiovinama vakuume.

Peptidinė derva suspenduojama 180 min. K reagento kokteilyje (King et al., Int. J. Pept. Prot. Res. 36:255-266 (1990), kuris čia cituojamas) (5 ml/g peptidinės dervos) kambario temperatūroje, po to atskelimo produktų mišinys nufiltruojamas į sausą dietilo eterį, iškritęs kietas produktas atskiriamas centrifuguojant ir džiovinamas virš KOH granulių. Išdžiovintas peptidas gryninamas HPLC, naudojant tinkamą 0,1 % TFA vandenyje ir acetonitrilo (ACN) gradientą. Surinkus porciją su norimu susintetintu produktu, peptido tirpalas liofilizuojamas ir peptidas identifikuojamas MS ir aminorūgščių sekos nustatymo metodų pagalba, patvirtinant, kad susintetintas norimas junginys.

Gryninant peptidą, nevalyto liofilizuoto peptido mėginys ištirpinamas mišinyje iš vandeninio 0,1 % TFA tirpalo, turinčio 10-50 % ACN. Peptido tirpalas paprastai filtruojamas per švirkštą, sujungtą su 0,45 μ m nailono "ACRODISC" 13 (Gelman Sciences; Ann Arbor MI) filtru. Tikslus nufiltruoto peptido tirpalas įleidžiamas į pusiau preparatyvinę C18 kolonėlę (Vydac Protein and Peptide C18, 218TP1010; The Separation Group; Hesperia CA). Eliuento (0,1 % TFA buferio ir ACN izochorinis mišinys arba gradientas) ištekJimo greitis palaikomas naudojant Beckman "SYSTEM GOLD" HPLC. Peptido eliuavimas stebimas UV detektoriaus pagalba ties 230 nm (Beckman, System Gold, programuojamas tirpiklio modulis 126 ir programuojamas detektoriaus modulis 166, valdomi "SYSTEM GOLD" programinės įrangos). MS pagalba identifikavus piką, atitinkantį susintetintą junginį, surinktas junginys liofilizuojamas ir

biologiškai išbandomas. MS registruojami SCIEX API III+ instrumentu. Be to, BMR spektrai registruojami General Electric prietaisu (300 MHz), heksadeuteriodimetilsulfoksido ar deuteriochloroforme (CDCl₃; Aldrich).

5 Aminorūgščių aldehydai susintetinti pagal gerai žinomas metodikas. Aminorūgščių ir peptidų aldehydai aprašyti, pavyzdžiui, Fehrents ir Castro, Synthesis 676 (1983); Bajusz et al., J. Med. Chem. 33:1729 (1990); Kawamura et al., Chem. Pharm. Bull. 17:902 (1969), Someno et al., Chem. Pharm. Bull., 34:1748 (1986), visi šie šaltiniai čia
10 cituojami. Peptidinės jungties redukovimas vyksta dipeptido molekulėje (t.y., Tyr-Ψ(CH₂NH)-Ile), tirpale, po to tinkamai apsaugotas dipeptidas prijungiamas prie likusio peptido, surišto su derva, naudojant kietafazės sintezės metodiką. Priešingai, apsaugotas aminorūgšties aldehydas prijungiamas prie peptido, surišto su derva pagal metodiką,
15 aprašytą Ho et al. (Pept. Res. 6:10-12 (1993) ir ten esančios nuorodos, visi šaltiniai čia cituojami).

II PAVYZDYS

Ac-Tyr-Ile-Arg-Leu-Ala-NH₂ sintezė

20

Sintetinama pagal metodiką, aprašytą aukščiau, naudojant 1 g Rink dervos (0,6 mmol NH₂/g dervos). Gautas peptidas analizuojamas MS pagalba. (M+H)⁺ : rasta 659,4, apskaičiuota (apsk.) 659,9.

25

III PAVYZDYS

Ac-Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂ sintezė

30

Ac-Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂ sintetinamas pagal I pavyzdyje aprašytą metodiką, naudojant 1 g Rink dervos (0,6 mmol NH₂/g dervos). Gautas peptidas turi (M+H)⁺ rasta 685,4, apsk. 685,9.

IV PAVYZDYS

Ac-(i-Bu)Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂ sintezė

Naudojama 1 g Rink dervos (0,6 mmol NH₂/g dervos).
5 Sintetinama pagal bendrą kietos fazės sintezės metodiką, nusakytą
aukščiau. Deblokavus Tyr ir tinkamai praplovus peptidinę dervą,
pridedama 50 ekvivalentų izobutilaldehido DMF, turinčiame 2 %
ledinės acto rūgšties. Susidaręs mišinys purtomas 4 val. kambario
temperatūroje. Praplovus peptidinę dervą DMF, turinčiu 2 % ledinės
10 acto rūgšties (2x8 ml), pridedama 1 g NaBH₃CN 10 ml DMF su 2 %
ledinės acto rūgšties. Peptidinė derva purtoma 30 min., po to
nufiltruojama, pridedama šviežiai pagaminto NaBH₃CN DMF/acto
rūgšties mišinyje ir reakcija tęsiama dar 30 min.

Po to peptidinė derva praplaunama DMF/2 % acto rūgšties
15 mišiniu (2x8 ml) ir DMF (2x8 ml). Susidariusi monoalkilinto peptido
derva acetilinama acto rūgšties anhidrido ir trietilamino mišiniu DMF
(30 ekvivalentų, 6 val.). Tinkamai praplovus peptidinę dervą, peptidas
atskeliamas ir deblokuojamas kaip aprašyta I pavyzdyje. Išgrynintas
HPLC pagalba peptidas analizuojamas MS. (M+H)⁺ : rasta 758,4, apsk.
20 758,5.

V PAVYZDYS

Tfa-(iBu)Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂ sintezė

25 Ta pati metodika, kaip aprašyta IV pavyzdyje, buvo naudota
(iBu)Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-Rink dervos sintezei. Galutinis
trifluoracetilimas atliktas 45 min. veikiant peptidinę dervą 0,7 M
trifluoracto rūgšties anhidridu, esant diizopropiletilaminui (DIEA) ir N-
metilimidazolui (NMI) (1:3:0,3 ekv). Peptido atskėlimas nuo dervos ir
30 jo išskyrimas atliktas kaip aprašyta IV pavyzdyje. Išgrynintas peptidas
analizuojamas MS. (M+H)⁺ : rasta 812,4, apsk. 812,5.

VI PAVYZDYS

Ac-Tyr-Ile-Arg-N(CH₃)O(CH₃) sintezė

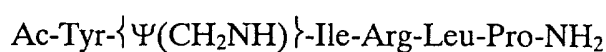
Boc-Arg(N^t-Tos)-N(CH₃)O(CH₃) susintetintas pagal literatūroje
5 aprašytą metodiką (Fehrentz and Castro, supra, 1983). 200 mg Boc-
Arg(N^t-Tos)-N(CH₃)O(CH₃) sumaišoma su 5 ml trifluoracto rūgšties
kambario temperatūroje ir maišoma 20 min. Pradinės medžiagos
išnykimas stebimas plonasluoksnės chromatografijos (TLC) pagalba,
eliuuojant CHCl₃:MeOH:CH₃COOH (90:9:1), vizualizuota
10 apipurškiant ninhidrinu ir apšviečiant UV lempa. Nugarinus likusį TFA
vakuume ir išdžiovinus vakuume virš KOH granulių gauta kieta
atitinkamos masės medžiaga. (M+H)⁺: rasta 371,2, apsk. 371,4.

Vienoje kolboje ištirpinama 150 mg aukščiau susintetintos
medžiagos 1 ml DMF, po to pridedama 57 µl trietilamino ir mišinys
15 atšaldomas iki 0 °C. Kitoje kolboje sausame tetrahidrofurane (THF)
ištirpinama 171 mg Z-Tyr-Ile-OH (Biochem Bioscience Inc.;
Philadelphia PA), atšaldoma iki -10 °C, azoto atmosferoje pridedama 44
µl NNM ir mišinys maišomas 15 min. Anksčiau pagamintas
Arg(Tos)N(CH₃)OCH₃ tirpalas DMF pridedamas į Z-Tyr-Ile-OH
20 dipeptido mišrų anhidridą ir mišinys maišomas 30 min. -10 °C
temperatūroje, po to per naktį kambario temperatūroje.

Apdorojus reakcijos mišinį kaip aprašyta I pavyzdyje, peptidas
išdžiovinamas vakuume ir jo maža porcija išgryninama HPLC bei
analizuojama MS; peptidas turi lauktą molekulinę masę (781).
25 Susidaręs peptidas Z-Tyr-Ile-Arg(Tos)-N(CH₃)OCH₃ sumaišomas su
500 µl anizolo ir deblokuojamas HF pagal įprastą metodiką. Apdorojus,
išskirta 169 mg produkto Tyr-Ile-Arg-N(CH₃)OCH₃, struktūra
identifikuota MS pagalba (rasta 493,6, apsk. 494). Likęs peptidas
ištirpintas 1 ml 1 N HCl ir liofilizuotas.

Tyr-Ile-Arg-N(CH₃)OCH₃.2HCl (76 mg) ištirpinta ACN, tirpalas atšaldytas iki 0 °C, pridėta 13 µl piridino, o po to 15 µl acto rūgšties anhidrido. Mišinys maišomas 3 val. 0 °C temperatūroje, reakcijos pabaiga nustatoma ninhidrino testu. Pamašius kambario temperatūroje 8 val., reakcijos mišinys apdorojamas ir produktas Ac-Tyr-Ile-Arg-N(CH₃)OCH₃ charakterizuojamas MS (rasta 535,6, apsk. 535,3).

VII PAVYZDYS



a. Fmoc-Tyr(But)-H sintezė

4,6 g (10,0 mmol) Fmoc-Tyr(But)-OH, 2,1 g (10,1 mmol) dicikloheksilkarbodiimido (DCC), 1,26 g (10,1 mmol) benzilmerkaptano ir 0,12 g DMAP reaguoja DCM kaip aprašyta Ho ir Ngu (*J. Org. Chem.* 58:2315 (1993), kuris čia cituojamas). Apdorojus reakcijos mišinį, išskiriamas Fmoc-Tyr(But)-S-CH₂C₆H₅, tioesteris suredukuojamas maišant su trietilsilanu ir 10% Pd/C, išgryninus staigios chromatografijos būdu gauna Fmoc-Tyr(But)-H 81 % išeiga. Produkto molekulinė masė ir BMR duomenys patvirtina laukiamą struktūrą.

b. Fmoc-Tyr(But)- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Ile-(O-alil) sintezė

Į 0,516 g (1,82 mmol) TFA.Ile-(O-alil) tirpalą 2 ml DMF pridedama 0,73 g (1,66 mmol) Fmoc-Tyr(But)-OH ir 0,209 g (3,32 mmol) NaBH₃CN 20 ml 1% AcOH/DMF. Po dviejų val. reakcijos mišinys apdorojamas ir galutinis produktas išgryninamas staigios chromatografijos pagalba (etilo acetatas:heksanas, 35:65), gauna aliejinį produktą, kurio BMR ir MS duomenys atitinka laukiamą struktūrą. (M+H)⁺ : rasta 599, apsk. 598,7.

c. Fmoc-Tyr(But)- $\{\Psi\text{CH}_2\text{NH}\}$ -Ile-OH sintezė

Į 0,467 g (0,78 mmol) Fmoc-Tyr(But)- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Ile-O-alilo tirpalą 10 ml DCM sudedama 89 µ (1,56 mmol) HOAc, 20 µl

trietilamino (TEA) ir 0,02 g komplekso $\text{PdCl}_2(\text{Ph}_3)_2$. Iš karto sudedama 231 μl (0,86 mmol) Bu_3SnH ir mišinys maišomas 1 val. kambario temperatūroje. Atitinkamai apdorojus reakcijos mišinį, produktas išgryninamas staigios chromatografijos pagalba ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$, 20:1) ir gaunama 0,319 g (išeiga 69 %) laukiamo peptido. $(\text{M}+\text{H})^+$: rasta 559, apsk. 558. Fmoc-Tyr(But)- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Ile-OH po to prijungiamas prie Arg(Pmc)-Leu-Pro-Rink dervos pagal bendrą kietafazės sintezės metodiką, nurodytą I pavyzdyje. Peptidinė derva Ac-Tyr(But)- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Ile-Arg(Pmc)-Leu-Pro-Rink derva deblokuojama ir peptidas atskeliamas įprastu būdu kaip aprašyta I pavyzdyje bei išgryninamas HPLC C18 kolonėlėje.

VIII PAVYZDYS

Ac-Tyr-Ile-Arg-NH- CH_2 (4-piridil) sintezė

Prie 0,862 g (0,6 mmol/g) oksimo dervos (DeGrado and Kaiser, *J. Org. Chem.* 45:1295 (1980)) per naktį prijungiama Boc-Arg(Tos)-OH, dalyvaujant DIC/HOBt. Derva praplaunama DMF, po to DCM ir acetilinama acto rūgšties anhidridu/DIEA (1:1 ekv) tirpalu DCM. Praplovus dervą DCM, DMF ir DCM, 30 min. deblokuojama 25 % TFA tirpalu DCM. Deblokuota derva praplaunama DCM, izopropanoliu ir DCM. Prie TFA.Arg(Tos)-OxmR prijungiama Boc-Ile-OH kaip simetrinis anhidridas (3 ekv), dalyvaujant 1,5 ekv DIEA tirpalo DCM. Praplovimo, acetilinimo ir deblokavimo ciklas, aprašytas aukščiau, kartojamas. Po deblokavimo Boc-Tyr(2-BrZ)-OH prijungiama tokiu pat būdu kaip Ile, tada galutinė peptidinė derva Boc-Tyr(2-BrZ)-Ile-Arg(Tos)-OxmR deblokuojama ir acetilinama, gaunant Ac-Tyr(2-BrZ)-Ile-Arg(Tos)-OxmR. Peptidinė derva išdžiovinama vakuume, iš viso gaunant 0,216 g.

Prie 1/3 dervos pridedama 100 μ l (800 μ mol) 4-(dimetilamino)piridino, 60 μ l ledinės acto rūgšties ir 120 μ l DIEA tirpalo 6 ml DCM. Derva purtoma per naktį kambario temperatūroje. Nufiltravus DCM tirpalą, derva praplaunama 3 ml DMF ir praplovimo
 5 tirpalas sujungiamas su DCM filtratu. Nugarinus tirpiklį, likęs peptidas deblokuojamas HF/anizolu, apdorojamas įprastiniu būdu ir gaunamas laukiamas peptidas. MS duomenys: (M+H)⁺ : rasta 582,3, apsk. 582.

IX PAVYZDYS

10 Ac-Tyr-Ile- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Arg-Leu-Pro-NH₂ sintezė

a. Boc-Ile-H sintezė

Aldehidas susintetintas iš 1 g Boc-Ile-N(Me)OMe kaip aprašyta Fehrentz ir Castro (*supra*, 1983). Aldehidas identifikuojamas TLC ir
 15 BMR metodais kaip aprašyta cituojamame šaltinyje.

b. Arg(Tos)-Leu-Pro-MBHA sintezė

Tripeptidinė derva susintetinta pagal bendrą kietafazės sintezės metodiką, aprašytą I pavyzdyje.

c. Boc-Ile- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Arg(Tos)-Leu-Pro-MBHA

20 Boc-Ile-H prijungiamas prie tripeptidinės Arg(Tos)-Leu-Pro-MBHA dervos redukuojančio amininimo būdu, naudojant NaBH₃CN tirpalą DMF, turinčiame 1 % acto rūgšties. Boc grupė atskeliama įprastu būdu ir Ac-Tyr-OH prijungiama naudojant DIC/HOBt. Gauta peptidinė derva (0,7 g) deblokuojama ir peptidas atskeliamas nuo
 25 dervos su HF/anizolo mišiniu. 19 g nevalyto Ac-Tyr-Ile- $\{\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Arg-Leu-Pro-NH₂ išgryninama HPLC C18 kolonėlėje, gaunama apie 5 mg laukiamo peptido, kurio grynumas >90 %. (M+H)⁺ : rasta 688,4, apsk. 687,9.

X PAVYZDYS

Ac-Tyr-Ile-Dab(N^γ-C₃H₇N)-Leu-Ala-NH₂ sintezė

0,2 g SCAL-TG (0,23 mmol NH₂/g) (Patek & Lebl, Tetr. Lett.
5 32:3891-3894 (1991), kuris čia cituojamas) prijungiama prie Fmoc-Ala-
OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-
Tyr(But)-OH pagal metodikas, aprašytas I pavyzdyje. Įvykdžius N-galo
acetilinimą ir šoninės grandinės deblokavimą TFA, peptidinę Ac-Tyr-
Ile-Dab-Leu-Ala-SCAL-TG derva praplaunama, neutralizuojama ir 2
10 val. veikama PyBroP/NMI DMF tirpale. Gautas peptidas atskeliamas
nuo dervos veikiant 1 M trifenilfosfinu/(CH₃)₃SiCl DCM tirpale (3x1
val.), po to 100 % TFA (1 val.). Nevalytas peptidas nusodinamas dietilo
eteriu, po to liofilizuojamas iš 0,1 % TFA vandeninio tirpalo. Peptidas
Ac-Tyr-Ile-Dab(N^γ-C₃H₇N)-Leu-Ala-NH₂ igryninamas HPLC ir
15 charakterizuojamas MS. (M+H)⁺ : rasta 676,4, apsk. 676,4.

XI PAVYZDYS

Ac-Tyr-Ile-PalMe(3)-NH₂ sintezė

Prie 1,0 g Rink dervos (0,48 mmol NH₂/g) prijungiama Fmoc-
20 Pal(3)-OH, Fmoc-Ile-OH ir Fmoc-Tyr(But)-OH pagal metodiką,
aprašytą I pavyzdyje. Prie 0,25 g gautos peptidinės dervos Fmoc-
Tyr(But)-Ile-Pal(3)-Rink pridedama 500 μl metilo jodido (MeI) tirpalo
DCM ir purtoma 6 val. Gauta peptidinė derva Fmoc-Tyr(But)-Ile-
25 PalMe(3)-Rink deblokuojama, acetilinama ir peptidas atskeliamas kaip
aprašyta I pavyzdyje. Dalis nevalyto peptido išgryninama HPLC ir
charakterizuojama MS.

XII PAVYZDYS

Ac-ciklo(Glu-Tyr-Ile-Arg-Leu-Lys)-NH₂ sintezė

5 Pagal I pavyzdyje aprašytą metodiką 1 g SCAL-TG (0,29 mmol NH₂/g) (žiūr. X pavyzdį) sujungiama su Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(But)-OH ir Fmoc-Glu(OtBu)-OH. Pašalinus Fmoc fragmentą, peptidinė derva acetilinama ir perplaunama DMF, po to DCM. Peptidinė derva Ac-Glu(OtBu)-Tyr(But)-Ile-Arg(Pmc)-Leu-Lys(Boc)-SCAL-TG
10 deblokuojama reagentu K, praplaunama, neutralizuojama ir ciklinama, panaudojant BOP/HOBt/DIEA (5:5:5 ekv.) DMF tirpale 2 val. Prisijungimo pabaiga stebima ninhidrino testu, kaip aprašyta Kaiser (Kaiser et al., Anal Biochem. 34:595 (1970), kuris čia cituojamas). Pasibaigus ciklizacijai, peptidas atskeliamas nuo dervos, išgryninamas
15 HPLC ir charakterizuojamas MS duomenimis. (M+H)⁺ : rasta 844,5, apsk. 844.5.

XIII PAVYZDYS

Ciklo(Gly-Tyr-Ile-Arg-Gly) sintezė

20 Prie 1 g oksimo dervos (žiūr. VIII pavyzdį) (0,6 mmol NH₂/g) per naktį prijungiama Boc-Gly-OH, dalyvaujant DIC/HOBt. Dervą praplovus ir deblokavus, pagal metodiką, aprašytą VIII pavyzdyje, prijungiama Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Ile-OH ir Boc-Tyr(2-BrZ)-OH.
25 Trečdalis peptidinės Boc-Tyr(2-BrZ)-Ile-Arg(Tos)-Gly-Oksimas dervos deblokuojama ir sujungiama su Boc-Gly DIC/HOBt terpėje. Gauta peptidinė derva deblokuojama, neutralizuojama ir per naktį ciklinama DMF, turinčiame 1 % acto rūgšties. Derva nufiltruojama ir praplaunama DMF, filtratai apjungiami ir organinis tirpiklis
30 nugarinamas vakuume. Likęs peptidas deblokuojamas HF/anizolu,

liofilizuojamas, išgryninamas HPLC ir charakterizuojamas MS. $(M+H)^+$
: rasta 547,8, apsk. 547,8.

XIV PAVYZDYS

5

N-pakeistų glicino darinių sintezė:

Ac-(Bzl)Gly-(Chx)Gly)-(3-guanidopropil)Gly-NH₂ sintezė

10

15

20

25

N-pakeistų glicinų sintezei panaudota Zuckermann et al. metodika (J. Am. Chem. Soc. 114:10646 (1992), kuris čia cituojamas).
Prie 1 g SCAL-TG (0,29 mmol NH₂/g) (žiūr. X pavyzdį) DCM/DMF
tirpale per simetrinę anhidrido ryšį prijungiama bromacto rūgštis.
Kiekviena prijungimo reakcija kartojama du kartus. Prie Br-CH₂CO-
SCAL-TG dervos pridedama Boc-NH-CH₂CH₂CH₂NH₂ DMSO tirpale
ir purtoma 2 val. Po deblokavimo, procesas kartojamas, kaitaliojant Br-
CH₂COOH prisijungimo prie dervos ir gautos dervos reakcijos su
atitinkamu aminu stadijas. (Bzl)Gly-(Chx)Gly-(Boc-NH-(CH₂)₃)Gly-
SCAL-TG derva acetilinama acto rūgšties anhidrido/DIEA/NMI
mišiniu (1:1:0,25) DMF tirpale per naktį. Deblokavus Boc grupę, derva
Ac-(Bzl)Gly-(Chx)Gly-(3-aminopropil)Gly-SCAL-TG veikiama 1,8 M
karboksiamidinopirazolo.HCl (Bernatowicz et al., J. Org. Chem.
57:2497-2502 (1992), kuris čia cituojamas) tirpalu DMF, esant DIEA
(1:1), 3 val kambario temperatūroje. Guanilinimo pabaiga stebima
Kaiserio testu. Susidariusio peptido atskėlimas ir apdorojimas
atliekamas pagal X pavyzdžio metodiką, analizuojama MS. $(M+H)^+$:
rasta 502,3, apsk. 502,3.

XV PAVYZDYS

Diketopiperazino darinių sintezė:

Ciklo(Ser-Ida)-Ile-Arg-Leu-Ala-NH₂ sintezė

5 Pradinis blokuotas tetrapeptidas Fmoc-Ile-Arg(Pmc)-Leu-Ala-Rink susintetintas panaudojant Fmoc ir Rink dervą (žiūr. I pavyzdį). Atskėlus Fmoc nuo peptidinės dervos, palaipsniui prijungiama Fmoc-Ida(OMe)-OH (3 ekv., DIC, HOBt) ir Fmoc-Ser(tBu)-OH (7 ekv., simetrinis anhidridas). Galutinis deblokavimas ir savaiminis ciklo
10 susidarymas įvyksta vienu metu, laikant 1 val. 50 % piperidine/DMF. Praplovus, susidaręs peptidas atskeliamas nuo dervos ir deblokuojamas TFA/tioanizolu/H₂O (95:2,5:2,5). Gautas peptidas apdorojamas kaip aprašyta aukščiau ir analizuojamas HPLC (>95%) ir MS. (M+H)⁺ : rasta 655,4, apsk. 655,38.

15

XVI PAVYZDYS

Ph-C(NOCH₂Ph)-CO-I-R-NH₂ sintezė

20

Prie 0,2 g Rink dervos prijungiama Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ile-OH, po to pašalinama apsauginė Fmoc grupė (žiūr. I pavyzdį). Prie peptidinės dervos Ile-Arg(Pmc)-Rink prijungiama Ph-C(NOCH₂Ph)-COOH naudojant DIC/HOBt kaip aprašyta aukščiau. Gauta peptidinė derva Ph-C(NOCH₂Ph)-CO-Ile-Arg(Pmc)-Rink apdorojama kaip aprašyta I pavyzdyje ir analizuojama MS. (M+H)⁺ : rasta 524,3, apsk. 524,6.

25

XVII PAVYZDYS

Ac-pAph-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂ sintezė

30

Sintezė vykdoma ant 100 mg Rink dervos pagal I pavyzdžio metodiką, naudojant šiuos aminorūgščių darinius: Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-pAph-

(Fmoc)-OH (raceminis mišinys). Peptidas atskeliamas ir išskiriamas pagal I pavyzdžio metodiką. Abu stereomeriniai peptidai išskiriami RP-HPLC pagalba ir identifikuojami MS. $(M+H)^+$: rasta 754,4, apsk. 754,5.

5

XVIII PAVYZDYS

Ac-Tyr-Chg-Arg-olio sintezė

10

15

Peptidinė seka konstruojama ant 0,25 g Fmoc-Arg(Pmc)-Sasrin dervos (0,5 mmol NH_2 /g dervos; Bachem Bioscience) pagal metodiką, aprašytą I pavyzdyje. Po N-galo Fmoc deblokavimo ir acetilinimo, apsaugotas peptidas redukuojant atskeliamas nuo dervos C-galo alkoholio pavidale (Mergler et al., Peptides p.177-178 (eds. Schneider and Eberle; Leiden 1993), kuris čia cituojamas). Peptidinė derva 24 val. purtoma su $NaBH_4$ (4 ekv.) tirpalu 2 ml THF:EtOH (6:1). Po atskėlimo reakcijos derva praplaunama DCM, atskėlimo reakcijos ir praplovimo tirpalai sujungiami ir liofilizuojami. Liofilizuotas peptidas deblokuojamas 2 val. veikiant TFA/vandeniui/tioanizolu (90:5:5) ir išskiriamas nusodinant. Išgrynintas HPLC peptidas analizuojamas MS. $(M+H)^+$: rasta 505,3, apsk. 505,3.

20

XIX PAVYZDYS

Ac-Tyr-Chg-Arg-olio acetato sintezė

25

Apsaugotas peptido alkoholis susintetintas kaip aprašyta XVIII pavyzdyje. 10 mg nevalytos medžiagos ištirpinama DCM/ACN ir 20 min. veikiama acto rūgšties anhidridu (2 mmol), esant 2,4 mmol TEA. Tirpalas nufiltruojamas, nugarinamas ir peptidas deblokuojamas kaip aprašyta aukščiau. Išgrynintas HPLC peptidas analizuojamas MS. $(M+H)^+$: rasta 547,3, apsk. 547,3.

30

XX PAVYZDYS

Ac-Phe(pNH₂)-Chg-Orn(C(NH)CH₃)-Leu-Pro-NH₂ sintezė

Prie 1 g "TENTAGEL S" NH₂ dervos (0,28 mmol NH₂/g dervos;
 5 Rapp Polymer; Tubingen Germany) prijungiamas SCAL tiltelis kaip
 aprašyta X pavyzdyje ir prijungiamos šios aminorūgštys: Fmoc-Pro-OH;
 Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Orn(Boc)-OH ir Fmoc-Chg-OH. Peptidinė derva
 Fmoc-Chg-Orn(Boc)-Leu-Pro-SCAL-TG veikiama 50 % DIEA DCM
 tirpale (2x30 s) ir du kartus DCM. Prie peptidinės dervos pridedamas
 10 1,5 g etilacetimidato hidrochlorido (Aldrich) tirpalas 4 ml
 piridino:DIEA ir 3 ml DMF ir prijungimas tęsiamas per naktį kambario
 temperatūroje.

Peptidinė derva Fmoc-Chg-Orn(C(NH)CH₃)-Leu-Pro-SCAL-
 TG deblokuojama 20 % piperidino tirpalu DMF 12 val., 4 kartus
 15 praplaunama DMF, 4 kartus DCM ir prijungiama Fmoc-Phe(pNH-
 BOC)-OH, naudojant DIC/HOBt DMF tirpale. Deblokavus Fmoc ir
 suacetilinus acto rūgšties anhidrido:piridino mišiniu (1:1) 20 min.,
 gaunama peptidinė derva Ac-Phe(pNH-BOC)-Chg-Orn(C(NH)CH₃)-
 Leu-Pro-SCAL-TG. SCAL tiltelis suhidrinamas, peptidas atskeliamas,
 20 išgryninamas HPLC ir gaunamas laukiamas junginys. (M+H)⁺ : rasta
 740,2, apsk. 740,48.

XXI PAVYZDYS

Ac-Phe(pNH₂)-Chg-Dap(N^B-C₆H₁₁N)-Leu-Pro-NH₂ sintezė

25 Prie 0,5 g SCAL-Tg (0,32 mmol NH₂/g) prijungiama Fmoc-Pro-
 OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Dap(Boc)-OH ir Fmoc-Chg-OH. Boc grupė
 šoninėje grandinėje pašalinama veikiant 50 % TFA 20 min., peptidinė
 derva neutralizuojama praplaunant 10 % DIEA/DCM. Laisva amino
 30 grupė šoninėje grandinėje paverčiama į dimetilamidinio grupę,
 paveikus peptidinę dervą 0,3 M PyBroP/NMI DMF tirpale 20 min.

Deblokuojant Fmoc grupę 50 % piperidino/DMF 60 min., šoninėje Dap grandinėje dimetilamidinio grupę pakeičiama piperidinio grupe. Seka papildoma prijungiant Fmoc-Phe(Boc)-OH, Fmoc grupę deblokuojama. Peptidas acetilinamas ir atskeliamas kaip aprašyta X pavyzdyje. Išvalytas HPLC peptidas analizuojamas MS. $(M+H)^+$: rasta 752,4, apsk. 752,4.

XXII PAVYZDYS

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂ sintezė

10

Raceminis H-Phe(pCN)-OH susintetintas pagal acetamidomalonato metodą (Wagner et al., VDR patentas Nr. 155954, 1982.07.21; peržiūrėtas 1988.11.08, kuris čia cituojamas). Raceminis Ac-pAph-OH susintetintas atitinkamo metiltioimidato, gauto ciano grupės reakcijoje su vandenilio sulfidu, amonolizės pagalba, po to metilinant MeI.

15

Peptido sintezei naudota 1 g "TENTAGEL" dervos (pakaitų kiekis = 0,21 mmol NH₂/g dervos) ir Knorr tiltelis (Bernatowicz et al., Tetr. Lett. 30:4645 (1989), kuris čia cituojamas). Dipeptidas Fmoc-Chg-Pal-Knorr-TG konstruojamas kaip aprašyta I pavyzdyje. 3-Piridilalaninas po to metilinamas 1 ml MeI per naktį DCM tirpale. Atskėlus Fmoc, Ac-pAph-OH prijungiamas panaudojant DIC/HOBt ir peptidas apdorojamas kaip aprašyta I pavyzdyje. $(M+H)^+$: rasta 550,3, apsk. 550,31.

20

25

XXIII PAVYZDYS

Ac-Tyr-Chg-pAph-Leu-Pro-NH₂ sintezė

Pentapeptidas Ac-Tyr(But)-Chg-Phe(pCN)-Leu-Pro-Knorr-TG konstruojamas ant 0,4 g "TENTAGEL" (pakaitų kiekis = 0,2 mmol NH₂/g dervos) kaip aprašyta I pavyzdyje. Derva veikiama per naktį

30

uždaramame inde 8 ml piridino/triethylamino mišiniu (75:25), prisotintu H_2S . Prie dervos prijungtas tioamidas 30 min. metilinamas 0,5 ml MeI 8 ml acetono 50 °C temperatūroje, po to praplaunamas acetonu ir metanoliu. Kad gautų galutinį produktą, metiltioimidui leidžia reaguoti su amonio acetatu metanolyje 3 val. 55 °C temperatūroje, po to produktas atskeliamas nuo dervos ir išgryninamas kaip aprašyta aukščiau. $(M+H)^+$: rasta 761,4, apsk. 760,43.

XXIV PAVYZDYS

Ac-Phe(pCH₂NH₂)-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂ sintezė

Ac-DL-Phe(pCN)-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂ (nevalytas peptidas) sintetinamas ant 1 g Rink dervos (0,6 mmol NH₂/g dervos) kaip aprašyta I pavyzdyje. 125 mg nevalyto peptido ištirpinama 50 ml MeOH ir pridedama 0,5 ml Renėjaus nikelio suspensijos (Aldrich). Peptido ir katalizatoriaus mišinys hidrinamas 35 psi (240,3 kPa) slėgyje 4 val. kambario temperatūroje. Katalizatorius nufiltruojamas, o tirpalas išgarinamas iki sausumo. Liekana liofilizuojama iš 0,1 % vandeninio TFA, turinčio 30% ACN. Išdžiovintas nevalytas produktas išgryninamas HPLC ir analizuojamas MS. $(M+H)^+$: rasta 741,4, apsk. 741,7.

XXV PAVYZDYS

Ac-Phe(pC(NO₂))NH₂)-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂ sintezė

21,1 mg nevalyto peptido, gauto XXIV pavyzdyje, sumaišoma su 60,3 mg NH₂OH.HCl (Aldrich) mišinyje iš 1,5 ml metanolio, 0,7 ml piridino ir 0,5 ml TEA. Mišinys maišomas 72 val. kambario temperatūroje, po to tirpiklis ir lakios medžiagos nugarinamos vakuume. Peptidas išgryninamas HPLC ir analizuojamas MS. $(M+H)^+$: rasta 770,4, apsk. 770,3.

XXVI PAVYZDYS

A1-A2-B junginių sintezė

5 A1-A2-B junginiai, t.y., A1-A2-(A3)_m-B junginiai, kuriuose m yra 0, sintetinami kaip parodyta Fig. 3. Trumpai tariant, racemino N-acetil-4-cianofenilalanino reakcijoje su L-cikloheksilglicino metilo esteriu gaunamas dviejų stereomerinių dipeptidų mišinys, kuris išskirstomas chromatografiškai. Raceminis N-acetil-4-cianofenilalaninas dalinai išskirstomas sudarant druską su L-cikloheksilglicino metilo esteriu.

10 Mažiau tirpi D,L-druska lengvai išsikristalina ir tolimesnis prijungimas duoda Ac-F(pCN)-Chg-OMe gana gryname pavidale. "Motininiai tirpalai" yra praturtinti L,L-druska ir prijungimas duoda nevalytą Ac-F(pCN)-Chg-OMe, kuris toliau gryninamas chromatografuojant per silikagelį. Šie dipeptido esteriai ličio hidroksidu metanolio/vandens

15 tirpale kambario temperatūroje hidrolizuojami iki atitinkamų rūgščių. Abi dipeptido rūgštys paverčiamos į pakeistus amidus įprastiniu būdu prijungiant atitinkamus aminus RNH₂. Aminai, kurių nėra prekyboje, susintetinti pagal standartines metodikas.

Ciano grupės pavertimas į atitinkamus amidinus atliekamas

20 pagal standartines chemines metodikas, arba per tioamidą ir metiltioamidatą, arba hidrinant atitinkamą amidoksimą (XXV pavyzdys). Pastarasis gaunamas reaguojant nitrilui su hidroksilaminu. Žemiau aprašyti pavyzdžiai iliustruoja pavadinime nurodytų junginių gavimą pagal šias parinktas metodikas. Aišku, kad išradimo junginiai

25 gali būti susintetinti, naudojant įvairias kitas metodikas ir čia pateikti pavyzdžiai yra parinkti patogumui.

XXVII PAVYZDYS

Ac-pAph-Chg-NHCH₂-(4-metilpiridinio) sintezė

Ac-pAph-Chg-NHCH₂-(4-metilpiridinio) sintezė atlikta pagal
5 XXII pavyzdžio metodikas iš Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂-(4-piridil).
Gautas junginys išgrynintas HPLC kaip aprašyta I pavyzdyje. MS
duomenys: (M+H)⁺ rasta 493,3, apsk. 493,29.

Pradinė medžiaga susintetinta tokiu būdu:

a) 2,32 g (10 mmol) Ac-(D, L)-F(pCN) šildant ištirpinta 75 ml
10 etanolio. Pridedama 1,75 g (10 mmol) L-cikloheksilglicino metilo
esterio ir mišinys 2 val. maišomas kambario temperatūroje.
Išsikristalinę kristalai nufiltruojami ir išdžiovinus gaunama 1,55 g D,L-
druskos. Filtratas dalinai nugarinamas ir praskiedžiamas eteriu.
Atskyrus kristalus ir išdžiovinus gaunama 2,1 g L,L-druskos, užterštos
15 D,L-druska. Nevalyta L,L-druska užpilama 20 ml DMF, 0,71 g HOBt ir
1,18 g DCC. Mišinys maišomas kambario temperatūroje 24 val.
Karbamidas nufiltruojamas, ir filtratas išgarinamas. Liekana ištirpinama
metileno chloride ir tirpalas praplaunamas 1 N HCl ir sočiu natrio
bikarbonato tirpalu. Organinis sluoksnis išdžiovinamas ir nugarinamas.
20 Liekana chromatografuojama per 60 g silikagelio, naudojant 20 %
acetoną metileno chloride kaip eliuentą. Iškristalinius sujungtas grynas
frakcijas iš metileno chlorido/eterio/heksano gauta 1,6 g bespalvių Ac-
F(pCN)-Chg-OMe kristalų, kurių lydymosi temperatūra (l.temp) 178-
180 °C.

b) 1,93 g (5 mmol) Ac-F(pCN)-Chg-OMe (gautas XXVII
25 pavyzdyje, žiūr. aukščiau), 100 ml metanolio, 10 ml vandens ir 0,75 g
ličio hidroksido hidrato 24 val. maišoma azoto atmosferoje kambario
temperatūroje. Pridėjus 2 ml acto rūgšties, tirpikliai nugarinami, o
liekana paskirstoma tarp metileno chlorido, turinčio 20 % izopropanolio
30 ir 1N HCl. Organinis sluoksnis išdžiovinamas ir nugarinamas, liekaną

iškristalinius iš metileno chlorido/eterio/heksano gaunama 1,6 g Ac-F(pCN)-Chg-OH bespalvių kristalų pavidale; l.temp. 216-218 °C.

5 c) 150 mg (0,4 mmol) Ac-F(pCN)-Chg-OH (žiūr. aukščiau), 65 mg (0,6 mmol) 4-aminometilpiridino, 124 mg (0,6 mmol) DCC, 60 mg (0,44 mmol) HOBt ir 5 ml DMF maišoma 20 val. kambario temperatūroje. Karbamidas pašalinamas filtruojant, o filtratas nugarinamas. Liekana užpilama metanolio, netirpus produktas nufiltruojamas ir gaunama 140 mg bespalvio Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂(4-piridil). Analitiškai grynus pavyzdys gaunamas chromatografuojant per silikagelį, eliuuojant acetono:metileno chlorido:metanolio mišiniu (4:5:1). Kristalinės kietos medžiagos l.temp > 250 °C.

10

XXVIII PAVYZDYS

15 Ac-F(4-amidino)-Chg-NHCH₂(4-metilpiridinio) sintezė

Šis junginys gaunamas reaguojant 150 mg Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂(4-piridil) (žiūr. aukščiau) su vandenilio sulfidu, po to su metilo jodidu ir amonio acetatu. Produktas išskirtas HPLC kaip homogeniška medžiaga. MS analizė: (M+H)⁺ : rasta 493,3, apsk. 493,29.

20

Pradinė medžiaga susintetinta tokiu būdu:

a) 2,8 g Ac-F(pCN), (L)-cikloheksilglicino metilo esteris, 940 mg HOBt, 1,57 g DCC ir 30 ml DMF maišoma 2 dienas kambario temperatūroje. Karbamidas pašalinamas filtruojant, filtratas nugarinamas. Liekana ištirpinama metileno chloride, tirpalas praplaunamas 1 N HCl ir 10 % vandeniniu natrio karbonato tirpalu. Organinė fazė išdžiovinama ir nugarinama. Iškristalinius liekaną iš metileno chlorido/eterio/heksano gaunama 2,05 g bespalvio Ac-F(pCN)-Chg-OMe, l.temp. 181-183 °C.

25

30 b) 1,93 g Ac-F(pCN)-Chg-OMe (žiūr. aukščiau) hidrolizuojama su 0,75 g ličio hidroksido monohidrato 100 ml metanolio ir 10 ml

vandens kaip aprašyta L,L-izomero atveju XXVII pavyzdyje aukščiau. Iškristalinus iš metileno chlorido/eterio, gauta 1,65 g Ac-F(pCN)-Chg-OH, l.temp. 180-182 °C.

c) 225 mg Ac-F(pCN)-Chg-OH (žiūr. aukščiau), 100 mg 4-aminometilpiridino, 90 mg HOBt, 180 mg DCC ir 6 ml DMF maišoma per savaitgalį kambario temperatūroje. Karbamidas nufiltruojamas, o filtratas nugarinamas. Liekana maišoma su metanolio, kietas nuosėdas nufiltravus gaunama 190 g kristalinio Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂(4-piridil), l.temp. > 250 °C.

XXIX PAVYZDYS

Ac-pAph-Chg-NHCH₂CH₂(3-metilpiridinio) sintezė

125 mg Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂CH₂(3-piridil), 2 ml DMSO, 10 ml piridino ir 5 ml trietilamino prisotinama vandenilio sulfidu, šaldant vandens/ledo mišinyje. Pamašius užlydytame inde per naktį kambario temperatūroje, tirpikliai nugarinami, liekana ištirpinama acetone/eteryje, išdžiovinus gauna 125 mg tioamido. Ši medžiaga užpilama 2 ml DMSO, 5 ml acetono ir 0,75 ml metilo jodido ir maišoma užlydytame inde per naktį kambario temperatūroje. Praskiedus toluenu, tirpikliai nugarinami ir liekana maišoma su eteriu. Eteris nudekantuojamas, vėl užpilama šviežiu eteriu ir maišoma, kol tasi medžiaga sukietėja, tada likęs eteris nufiltruojamas, o liekana išdžiovinama.

Susidariusi liekana ištirpinama 20 ml metanolio ir veikiama 0,3 ml acto rūgšties ir 0,4 g amonio acetato. Mišinys kaitinamas 2,5 val. iki 55-60 °C, po to tirpikliai nugarinami. Liekana ištirpinama vandens/ACN/TFA mišinyje ir liofilizuojama. Produktas gryninamas HPLC. MS duomenys: (M+H)⁺ : rasta 507,3, apsk. 507,31.

Pradinė medžiaga gaunama tokiu būdu:

150 mg (0,4 mmol) Ac-F(pCN)-Chg-OH, 120 mg (0,6 mmol) 2-(3-piridil)etilamino hidrochlorido, 125 mg DCC, 60 mg HOBt, 0,5 ml diizopropiletilamino ir 10 ml DMF maišoma 24 val. kambario temperatūroje. Nugarinus tirpiklį, liekana maišoma su metanoliu, netirpus produktas nufiltruojamas, praplaunamas metanoliu ir eteriu ir gaunama 110 mg bespalvių kristalų. Filtratas nugarinamas, o liekana ištirpinama metileno chloride/izopropanolyje. Šis tirpalas praplaunamas 10 % vandeniniu natrio bikarbonato tirpalu, išdžiovinamas ir nugarinamas. Liekana chromatografuojama per 14 g silikagelio, eliuuojant metileno chlorido:acetono:metanolio mišiniu 5:4:1, gaunama 40 mg Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂CH₂(3-piridil), l.temp. 265-268 °C.

b) 2-(3-piridil)etilamino dichidrochloridas gaunamas tokiu būdu: mišinys iš 1,3 g 3-piridilacetoniitrilo, apytikriai 3 g Renėjaus nikelio ir 30 ml metanolio, turinčio 10 tūrio % amoniako hidrinama 20 val. Paro hidrinimo aparate 35 psi (240 kPa) slėgyje. Katalizatorius nufiltruojamas per celitą, o filtratas nugarinamas. Liekana ištirpinama metileno chloride, išdžiovinama magnio sulfatu, nufiltruojama ir nugarinama. Produktas paverčiamas į dihidrochloridą vandenilio chloridu dioksane. Iškristalinus iš metanolio/eterio, gauta 1,4 g bespalvių kristalų, l.temp 145-148 °C.

XXX PAVYZDYS

Ac-pAph-Chg-NHCH₂CH₂(4-metilpiridinio) sintezė

Šis junginys susintetintas pagal aukščiau aprašytas metodikas reaguojant Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂CH₂(4-piridil) su vandenilio sulfidu, po to metilinant metilo jodidu ir reaguojant su amonio acetatu. Produktas išgryninamas HPLC. MS duomenys: (M+H)⁺: rasta 507,3, apsk. 507,31.

Pradinė medžiaga gaunama reaguojant Ac-F(pCN)-Chg-OH su 2-(4-piridil)etilamino dihidrochloridu kaip aprašyta XXIX pavyzdyje aukščiau.

5 2-(4-Piridil)etilamino dihidrochloridas sintetinamas pagal metodiką, aprašytą 2-(3-piridil)etilamino dihidrochloridui, hidrinant piridil-4-acetonitrilą virš Renėjaus nikelio, esant amoniakui. Dihidrochlorido l.temp 220 °C.

XXXI PAVYZDYS

10 Ac-pAph-Chg-NHCH₂(4-amidinofenil) sintezė

Šis junginys susintetintas panašiu būdu kaip aprašyta aukščiau, veikiant Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂(4-cianofenil) vandenilio sulfidu DMSO, piridino ir trietilamino tirpale. Gautas bis-tioamidas metilinamas metilo jodidu DMSO/acetone, po to produktas reaguoja su amonio acetatu, kaip aprašyta aukščiau. Produktas gryninamas HPLC. MS duomenys: (M+H)⁺ : rasta 520,3, apsk. 520,30.

15

Pradinė medžiaga gaunama tokiu būdu: 75 mg (0,2)mmol) Ac-F(pCN)-Chg-OH, 50 mg (0,3 mmol) (4-cianofenil)metilamino hidrochlorido, 62 mg DCC, 30 mg HOBt, 0,2 ml DIEA ir 2 ml DMF maišoma kambario temperatūroje 24 val. Nufiltravus, tirpiklis nugarinamas, o liekana ištirpinama metileno chloride, turinčiame 20 % izopropanolio. Tirpalas praplaunamas 1N HCl ir 10 % vandeniniu natrio karbonato tirpalu, po to išdžiovinamas ir nugarinamas. Liekana maišoma su mažu kiekiu metanolio/vandens mišinio, išsiskyrusios nuosėdos atskiriamos ir išdžiovinamos, gaunama 80 mg Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂(4-cianofenil).

20

25

(4-cianofenil)metilamino hidrochloridas gaunamas tokiu būdu: 2 g (10 mmol) α-brom-p-toluenonitrilo, 2 g (10,8 mmol) kalio ftalimido ir 30 ml DMF virinama su grįžtamu šaldytuvu 1 min. Atšaldžius, mišinys parūgštinamas acto rūgštimi ir, praskiedus vandeniu, produktas

30

išsikristalina. Kristalai nufiltruojami, praplaunami vandeniu, išdžiovinus gaunama 2,24 g bespalvio N-(4-cianofenil)metilftalimido, l.temp. 182-184 °C.

5 1,5 g N-(4-cianofenil)metilftalimido suspenduojama 50 ml verdančio metanolio ir veikiama 1 ml hidrazino hidrato. Tirpalas pasidaro skaidrus po 5 min. Metanolis nugarinamas, o liekana veikiama 2 N HCl. Suspensija kaitinama iki virimo, po to atšaldoma ledu. Nuosėdos nufiltruojamos, filtratas nugarinamas. Liekana ištirpinama vandenyje. Tirpalas vėl užkaitinamas iki virimo, atšaldomas ir
10 nufiltruojamas. Filtratas pašarminamas natrio šarmu ir ekstrahuojamas metileno chloridu, turinčiu izopropanolio. Organinė fazė išdžiovinama ir nugarinama, liekana paverčiama į hidrochlorido druską, iškristalinus iš izopropanolio/eterio gaunama 0,43 g bespalvių kristalų, l.temp > 260 °C.

15 (3-Cianofenil)metilamino hidrochloridas gautas reaguojant α -brom-m-toluenonitrilui su kalio ftalimidu, gaunama N-(3-cianofenil)metilftalimidas, l.temp. 147-148 °C. Šiai medžiagai sureagavus su hidrazino hidratu ir produktą pavertus į hidrochloridą, kaip aprašyta aukščiau, gaunama (3-cianofenil)metilaminas, l.temp 223-
20 226 °C.

XXXII PAVYZDYS

Ac-pAph-Chg-NHCH₂(3-amidinofenil) sintezė

25 Šis junginys gautas pagal metodikas, aprašytas aukščiau. Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂(3-cianofenil) veikiamas vandenilio sulfidu DMSO, piridino ir trietilamino mišinyje. Gautas bis-tioamidas metilinamas metilo jodidu DMSO/acetone, produktas po to reaguoja su amonio acetatu, kaip aprašyta aukščiau. Produktas gryninamas HPLC.
30 MS duomenys: (M+H)⁺ : rasta 520,3, apsk. 520,30.

Pradinė medžiaga gaunama tokiu būdu: 300 mg (0,8 mmol) Ac-F(pCN)-Chg-OH, 200 mg (1,2 mmol) (3-cianofenil)metilamino hidrochlorido, 250 mg DCC, 120 mg HOBt, 0,8 ml DIEA ir 10 ml DMF maišoma kambario temperatūroje 24 val. Nufiltravus, tirpiklis nugarinamas, o liekana ištirpinama dideliame tūryje metileno chlorido, turinčio 20 % izopropanolio. Tirpalas praplaunamas 1 N HCl ir 10 % vandeniniu natrio karbonato tirpalu, išdžiovinamas ir nugarinamas. Liekana maišoma su izopropanoliu/eteriu ir atskirtos nuosėdos išdžiovinamos; gauna 400 mg Ac-F(pCN)-Chg-NHCH₂(3-cianofenil).

XXXIII PAVYZDYS

Ac-pAph-Chg-NHCH(Me)(4-metilpiridinio) sintezė

Pavadinime nurodyto junginio diastereomerų mišinys gaunamas reaguojant dviejų stereomerinių Ac-F(pCN)-Chg-NHCH(Me)(4-piridil) mišiniui su vandenilio sulfidu, po to su MeI ir amonio acetatu. Diastereomerai atskiriami HPLC. MS duomenys: (M+H)⁺: rasta 507,3, apsk. 507,31.

Pradinė medžiaga susintetinama tokiu būdu: 150 mg (0,4 mmol) Ac-F(pCN)-Chg-OH, 120 mg (0,6 mmol) raceminio 1-(4-piridil)etilamino hidrochlorido, 125 mg DCC, 60 mg HOBt, 0,5 ml DIEA ir 10 ml DMF maišoma kambario temperatūroje 24 val. Nufiltravus, tirpiklis nugarinamas ir liekana ištirpinama dideliame tūryje metileno chlorido, turinčio 20 % izopropanolio. Tirpalas praplaunamas 10 % vandeniniu natrio karbonatu, išdžiovinamas ir nugarinamas. Liekana maišoma su izopropanoliu/eteriu, atskirtos nuosėdos išdžiovinamos ir gaunama 125 mg Ac-F(pCN)-Chg-NHCH(Me)(4-piridil) dviejų diastereomerų mišinys.

Raceminis 1-(4-piridil)etilamino dihidrochloridas sintetinamas 1 g 4-acetilpiridino-N-oksido, 2 g Renėjaus nikelio ir 30 ml metanolio, turinčio 20 tūrio % amoniako, hidrinant 30 psi (205,95 kPa) slėgyje 24

val. Katalizatorius pašalinamas filtruojant per celitą, filtratas nugarinamas. Liekana ištirpinama metileno chloride, nufiltruojama ir išgarinama. Liekana ištirpinama izopropanolyje ir veikiama vandenilio chloridu eterijoje. Iškritę kristalai atskiriami ir išdžiovinami, gauna 0,9 g medžiagos, l.temp. 198-200 °C.

XXXIV PAVYZDYS

DIPA(m)pAph-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂ sintezė

10 a. (p-cianobenzil)malono rūgšties (DIPA(m)Phe(pCN))-OH N,N-diizopropilamido sintezė

2-(p-cianobenzil)malono rūgštis susintetinta pagal modifikuotą metodiką (žiūr. Pinori et al., JAV patentas Nr. 5061911 (1991), kuris čia cituojamas). Į 3,8 g 2,2-dimetil-1,3-dioksan-4,6-diono (Meldrumo rūgštis, Aldrich) ir 1,12 g NaCNBH₃ (Aldrich) tirpalą 25 ml DMF pridedama 2,3 g p-cianobenzaldehydo (Aldrich) ir mišinys maišomas kambario temperatūroje 2 val. Į reakcijos mišinį įpilama 400 ml vandens, tirpalas atšaldomas ledo vonioje ir parūgštinamas iki pH 3,8-4 lašinant 20 % vandeninį HCl tirpalą. Baltos nuosėdos surenkamos ant Biuchnerio piltuvo ir praplaunamos šaltu vandeniu. Surinktos nuosėdos džiovinamos vakuume virš CaCl₂ 24 val. Kietos medžiagos BMR spektras (CDCl₃ tirpale) patvirtino 2,2-dimetil-5-(p-ciano)benzil-1,3--dioksan-4,6-diono (DCBD) struktūrą. Junginio l.temp. 135-142 °C ir R_f 0,45 (CHCl₃:MeOH:acto rūgštis - 95:4:1).

25 Į 1,5 ml diizopropilamino 45 ml DCM pridedama 3 ml N,O-bis(trimetilsilil)acetamido (BSA) ir tirpalas virinamas kolboje su magnetine maišykle ir CaCl₂ vamzdeliu apsaugotu grįžtamu šaldytuvu 7 val. Atšaldžius reakcijos mišinį iki kambario temperatūros, pridedama 0,8 g DCBD ir reakcijos mišinys virinamas su grįžtamu šaldytuvu, kol TLC parodo pilną produkto susidarymą. Atšaldžius reakcijos mišinį, atsargiai pridedama 5-8 ml 20 % vandeninio HCl tirpalo. Atskyrus

sluoksnius, organinis sluoksnis praplaunamas vandeniu, išdžiovinamas MgSO_4 ir sausai išgarinamas, gaunamas švarus produktas, kuris naudojamas kitoje stadijoje be jokio valymo. Junginiai identifikuojami BMR spektrais (CDCl_3) ir MS.

5

b. DIPA(m)pAph-Chg-Arg-Leu-Pro- NH_2 sintezė

Peptidinė derva DIPA(m)Phe(pCN)-Chg-Arg(PMC)-Leu-Pro-Rink susintetinta pagal metodiką, aprašytą I pavyzdyje. Gauta peptidinė derva veikiama hidroksilamino hidrochloridu, kaip aprašyta XXV pavyzdyje ir gaunama DIPA(m)Phe(pC(NOH) NH_2)-Chg-Arg(PMC)-Leu-Pro-Rink. Atskėlus peptidą nuo dervos ir liofilizavus, nevalytas produktas (120 mg) ištirpinamas 80 ml MeOH ir 10 ml sotaus NH_3 tirpalo MeOH. Į reakcijos mišinį pridedama 0,25 ml Renėjaus nikelio suspensijos (Aldrich) ir mišinys hidrinamas 45 psi (308,9 kPa) slėgyje 24 val. Katalizatorius nufiltruojamas, tirpiklis nugarinamas iki sausumo ir liekana liofilizuojama iš 1:1 tirpiklio iš 0,1 % vandeninio TFA tirpalo ir ACN. Peptidas išgryninamas HPLC ir identifikuojamas MS. $(\text{M}+\text{H})^+$: rasta 824,2, apsk. 824,5.

10

15

XXXV PAVYZDYS

20

Susintetinti junginiai su daugeliu pakaitų, pastebėti kaip stiprūs
Faktoriaus Xa inhibitoriai

Eil.Nr	Junginys	Apsk.	Rasta
1.	Ac-(2- CF_3Bzl)-Y-I-R-L-P- NH_2	860,5	860,3
2.	Ac-($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{CH}_2$)-Y-I-R-L-P- NH_2	786,5	786,5
3.	CH_3OCO -Y-I-R-L-P- NH_2	742,4	742,4
4.	Ac-Y-Chg-R- NH_2	518,2	518,2
5.	Nal(2)-Cha-R-D(O-alil)- NH_2	679,4	679,4
6.	y-Tle-R-Nle-P- NH_2	660,4	660,4

7.	Phe(pF)-I-R-L-P-NH	662,3	662,3
8.	Ac-(D)Tic(OH)-I-R-L-P-NH ₂	714,4	714,4
9.	Ac-Phe(pCN)-I-R-L-P-NH ₂	711,4	711,4
10.	Ac-Phe(pCONH ₂)-Chg-R-L-P-NH ₂	755,4	755,4
11.	y-Chg-R-NH ₂	476,2	476,2
12.	Ac-W-Chg-R-L-P-NH ₂	751,3	751,3
13.	Ac-Y-I-R-NH-CH(CH ₃)-(CH ₂) ₂ -CH ₃	562,3	562,3
14.	Ac-Y-Pgl-R-L-P-NH ₂	722,2	722,2
15.	Ac-Y-Chg-R-Ina-NH ₂	629,4	629,4
16.	Ac-Tza-Chg-R-NH ₂	509,3	509,3
17.	Ac-Y-Chg-R-Pip-NH ₂	629,4	629,4
18.	Ac-Phe(pNH ₂)-Chg-R-NH ₂	517,2	517,2
19.	Ac-(Bzl)G-(Chx)Gly-(3-guanidopropil)G-NH ₂	502,3	502,3
20.	Ac-Y-Chg-R-ol.acetatas	547,3	547,3
21.	Ac-Y-Chg-R-OCH ₃	533,3	533,3
22.	Ac-Y-Chg-R-OH	519,3	519,3
23.	Bz-Y-Chg-R-NH ₂	532,2	532,2

XXXVI PAVYZDYS

Deriniai cheminių pakaitų, kurie kiekvienas atskirai neveikia
aktyvumo, gali padidinti aktyvumą

5

Buvo matuojamas Faktoriaus Xa aktyvumo inhibavimas. Tačiau išradimo peptido aktyvumo matu gali būti apibūdintas bet koks tinkamas biologinio aktyvumo matas, toks kaip išradimo YIR peptido įtaka koaguliacijai, veikimo *in vivo* stiprumas, skilimo *in vivo* pusperiodis, peroralinis biologinis įsisavinimas, peroralinis veikimo stiprumas ar skilimo pusperiodis.

10

Aprašyta daug konkrečių pakeitimų. Pavyzdžiui du pakaitai įvedami kartu, siekiant pademonstruoti, kad tokiu būdu padidinamas

aktyvumas, netgi kur pradiniai pavieniai pakaitai žymiau nepadidina aktyvumo. Vienas cheminis pakeitimas duoda junginį Ac-Y-I-R-L-P, kurio $K_i = 0,49 \mu\text{M}$, ir junginį (iBu)Y-I-R-L-P, kurio $K_i = 2,6 \mu\text{M}$, palyginus su pradiniu junginiu Y-I-R-L-P, kurio $K_i = 5,3 \mu\text{M}$. Įvedę šiuos abu pakaitus, gauname junginį Ac-(iBu)Y-I-R-L-P-NH₂, kurio $K_i = 0,04 \mu\text{M}$. Taigi, šie rezultatai parodo, kad išradimo peptidas, turintis dviejų cheminių pakaitų derinį, gali turėti žymiai didesnę inhibavimo aktyvumą, palyginus su tais viena pakaitą turinčiais analogais, netgi kai vienas junginys, kaip (iBu)Y-I-R-L-P-NH₂ neturi žymiai padidinto aktyvumo, lyginant su pradiniu Y-I-R-L-P-NH₂ junginiu.

3 lentelėje pateikiamos cheminės modifikacijos, duodančios junginius, kurių K_i yra tarp $100 \mu\text{M}$ ir 1 pM Faktoriaus Xa inhibavimo reakcijoje.

3 lentelė. Faktoriaus Xa inhibitoriai, kurių $K_i < 100 \mu\text{M}$

Struktūra	MS*	AA*
(2,2-DiMe-propil) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(2-CF ₃ -Bzl) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(2-Et-nBu) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(2-Me-Bzl) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(2-Me-nBu) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(2-Me-n-pentil) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(3,3-DiMe-nBu) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
3-fenoksipropionil-Y-Chg-R-NH ₂	OK	OK
5-Bzim-CO-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
5-Bzim-Co-F(pNH ₂)Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
y(3,5-Br)- I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Y(3,5-I) I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(Chx-CH ₂) Y- I-R -L-P-NH ₂	OK	OK

(iBu) Y- I-R-OH	OK	OK
(iBu) Y- I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
(iBu) Y- I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(Me) _y - I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
(Me) _Y I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
(Me) _y I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(Me) _Y I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
5-Hic-Chg-R-NH ₂	OK	OK
Ac-(1,2,3,6-4H-Bzl)Y(SO ₃ H)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(1,2,3,6-4H-Bzl)Y- I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(2,3-DiMe-n-pentil)Y(SO ₃ H)-I-R-L-P-NH ₂		
Ac-(2,3-DiMe-n-pentil)Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(2-CF ₃)-Bzl)Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(2-CF ₃)-Bzl) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac(2Et-nBu)Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac(2-Me-Bzl)Y(SO ₃ H)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac(2-Me-Bzl) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(2-Me-nBu)Y(SO ₃ H)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(2-Me-nBu)Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(2-Me-n-pentil)Y(SO ₃ H)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(2-Me-n-pentil) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(3,3-DiMe-nBu)Y(SO ₃ H)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(3,3-DiMe-nBu) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(3,3-DiMe-n-pentil)Y(SO ₃ H)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(3,5,5-Me-3-n-heksil) Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Ac-(3,5,5-Me-3-n-heksil) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(4-piridil)-CH ₂ -) Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Ac-(4-MeO-Bzl) Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Ac-(Bzl) Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Ac-(Chx-CH ₂) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(cikopropil-CH ₂)Y(SO ₃ H)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK

Ac-(cikopropil-CH ₂) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(Et-CH=C(CH ₃ -CH ₂)Y(SO ₃ H)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(Et-CH=C(CH ₃ -CH ₂) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(iBu)F(pNH ₂)-Chg-R-NH ₂	OK	OK
Ac-(iBu)F(pNH ₂)-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(iBu)Nal(2)-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(iBu)Y-Chg-R-NH ₂	OK	OK
Ac-(iBu)Y-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(iBu)Y-I-Dab(N ^γ -C ₃ H ₇)-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(iBu)Y-I-Orn(N ^δ -C ₃ H ₇ N)-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(iBu)Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Ac-(iBu)Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(Me)Y-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(Me)Y-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
Ac-(Me) Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(nBu)Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Ac-(trans-CH ₃ -CH=C(CH ₃)-CH ₂)Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Tyr(3,5-NO ₂)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-(Bzl)G-(Chx)Gly-(3-guanidopropil)G-NH ₂	OK	OK
Ac-βAla-Y-I-R-G-NH ₂	OK	OK
Ac- <u>E-Y-I-R-L-K</u> -NH ₂	OK	OK
Ac- <u>E-Y-I-R-L-P-K</u> -NH ₂ **	OK	OK
Ac-F(pCONH ₂)-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-F(pCONH ₂) -I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-F(pF)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-f(pF)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-F(pCN)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-F(pNH ₂)-Chg-R-NH ₂	OK	OK
Ac-F(pNH ₂)-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK

Ac-F(pNH ₂)- I- R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-F(pNH ₂)-Chg-R-(Bzl)G-G-OH	OK	OK
Ac-F(pNH ₂)-Chg-R-(Chx)G-G-OH	OK	OK
Ac-F(pNH ₂)-Chg-R-(CH ₃ CH ₂ CH ₂ (CH ₃))G-G-OH	OK	OK
Ac-G-G-Y-I-R-G-NH ₂	OK	OK
Ac-G-Y-Nle-R-L-NH ₂	OK	OK
Ac-G-Y Nle-R-L-NH ₂	OK	OK
Ac-G-Y-I-R-G-NH ₂	OK	OK
Ac-G-Y-I-R-L-NH ₂	OK	OK
Ac-Nal(1)-I-R-L-P- NH ₂	OK	OK
Ac-Nal(2)-Cha-R-D(O-alil)- NH ₂	OK	OK
Ac-Nal(2)-Cha-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Nal(2)-Chg-R-NH ₂	OK	OK
Ac-Nal(2)-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Nal(2)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Pgl(OH)-I-R-L-NH ₂	OK	OK
Ac-pAph-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-pAph-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Phe(pGua)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-S-Y- I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-W-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-W-L-R-L-A-NH ₂	OK	OK
Ac-Y(Me)- I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
Ac-Y(Me)- I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-(allo-1)-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-Cha-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-Chg-R-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-Chg-R-NH-CH ₂ CH ₂ -N(CH ₃) ₄	OK	OK
Ac-Y-Chg-R-NH-Bzl-4-OMe	OK	OK
Ac-Y-Chg-R-NH-CH ₂ -Chx	OK	OK

Ac-Y-Chg-R-NH-CH ₂ CH ₂ -O-CH ₃	OK	OK
Ac-Y-Chg-R-NH-CH ₂ CH ₂ -COOH	OK	OK
Ac-Y-Chg-R-NH-Chx	OK	OK
Ac-Y-Chg-R-NH-CH ₂ (2-(1-Et)pirolidinil)	OK	OK
Ac-Y-Chg-R-NH-CH ₂ (2-(6-EtO)benziltiazolil)	OK	OK
Ac-Y-Chg- R-L-P -NH ₂	OK	OK
Ac-Y-Chg-R(NO ₂)-Ψ(CH ₂ NH)Ψ-L-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-Chg-R-NH-CH ₂ CH ₂ -N-(CH ₃) ₂	OK	OK
Ac-Y-Nva-R-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-Pen(Me)-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-Pgl-R-L-P -NH ₂	OK	OK
Ac-Y-Ψ(CH ₂ N(Ac))Ψ-I-R-L-P -NH ₂	OK	OK
Ac-Y-Ψ(CH ₂ NH)Ψ-I-R-L-P- NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-R-Ψ(COCH ₂)Ψ-G-P- NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-Dab(Nγ-C ₃ H ₇ N)-L-A- NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-hR-L-A- NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-hR-L-A- NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-PalMe(3)- NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-PalMe(3)-L-P- NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-Ψ(CH ₂ NH)Ψ-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-y-I-R-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-R-N(Me)O-CH ₃	OK	OK
Ac-Y-I-R-NH-CH ₂ -4-piridil	OK	OK
Ac-Y-I-R-NH-CH ₂ CH ₂ -N(CH ₃) ₂	OK	OK
Ac-Y-I-R-NH-4-morfolinil	OK	OK
Ac-Y-I-R-NH-OCH ₃	OK	OK
Ac-Y-I-R-Nle-Hyp	OK	OK
Ac-Y-I-R-Nle-Δ ² p	OK	OK
Ac-Y-I-R-piperidil	OK	OK

Ac-Y-I-R-I-P	OK	OK
Ac-Y-I-R-L	OK	OK
Ac-y-I-R-L-A	OK	OK
Ac-Y-I-R-L-A	OK	OK
Ac-Y-I-R-L-A-A-F-T-NH ₂	OK	OK
Ac-y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-I-R-L-P-Dab(Ac-Y-I-R-L-P(G-A) ₃)-OH	OK	OK
Ac-Y-I-R-L-P-Dab(Ac-Y-I-R-L-P(G-A) ₆)-OH	OK	OK
Ac-Y-I-R-L-P-Dab(Ac-Y-I-R-L-P)-OH	OK	OK
Ac-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Y- <u>K-R-L-E</u> -NH ₂	OK	OK
Ac-Y-N-R-L-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-N-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Ac-Y-T(Me)-R-L-P-NH ₂	OK	OK
<u>βAla-Y-I-R-G</u>	OK	OK
βAla-Y-I-R-G-NH ₂	OK	OK
Caff-I-R-NH ₂	OK	OK
Cbz-I-R-L-NH ₂	OK	OK
Cbz-Y-I-R-NH ₂	OK	OK
CClF ₂ -CO-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
CF ₂ H-CO-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
CF ₃ -CF ₂ -CO-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
CH ₃ -CHCl-CO-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
CH ₃ -O-CO-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
CH ₃ -SO ₂ -Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
CH ₃ CH ₂ -O-CO-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Cl ₂ CHCO-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
ClCH ₂ CO-Y-I-R-NH ₂	OK	OK
<u>C-Y-I-R-L-C</u> -NH ₂	OK	OK
D-Tic-I-R-L-A-A-F-T-NH ₂	OK	OK

Et(Et)Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
<u>E-Y-I-R-K-NH₂</u>	OK	OK
<u>E-Y-I-R-L-K-NH₂</u>	OK	OK
<u>E-Y-I-R-L-P-K-NH₂</u>	OK	OK
F(pCl)-I-R-I-Sar-NH ₂	OK	OK
F(pF)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
f(pF)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
F(pNH ₂)-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
F(pNO ₂)-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
f-I-R-F-P-NH ₂	OK	OK
f-I-R-I-P-NH ₂	OK	OK
F-I-R-L-NH ₂	OK	OK
F-I-R-L-P-H-Y-G-NH ₂	OK	OK
F-I-R-L-Y-V-W-N-NH ₂	OK	OK
For-y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
For-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
G-G-Y-I-R-G-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-D-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-F-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-G-NH ₂	OK	OK
<u>G-Y-I-R-G</u>	OK	OK
G-Y-I-R-H-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-I-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-K-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-L-P-A-M-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-L-P-P-V-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-L-P-Q-T-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-L-P-S-Q-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-S-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-T-V-NH ₂	OK	OK

G-Y-I-R-V-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-W-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-Y-NH ₂	OK	OK
G-Y-I-R-L-NH ₂	OK	OK
(pOH)C ₆ H ₄ -CH ₂ CH ₂ (OH)-CO-I-R-L-Sar-NH ₂	OK	OK
(pOH)C ₆ H ₄ -CH ₂ CH ₂ CO-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
(pOH)C ₆ H ₄ -CH ₂ CH ₂ CO-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(pOH)C ₆ H ₄ -CH ₂ CHOH-CO-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(pOH)C ₆ H ₄ -OCH(CH ₃) CO-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
(pOH)C ₆ H ₄ -OCH ₂ CO-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
I-H-L-W-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
I-H-L-W-y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
I-Q-L-G-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
4-MeO-C ₆ H ₄ -CO-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
N-morfolinil-CO-F-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Nal(2) -Cha-R-D(O-alil)-NH ₂	OK	OK
Nal(2) -Cha-R-D(O-alil)-Sar-NH ₂	OK	OK
Nal(2)-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Nal(2)-I-R-C(Me)-P-NH ₂	OK	OK
N-G-Y-I-R-L-I-H-NH ₂	OK	OK
pal-C(SBut)-R-L-P-NH ₂	OK	OK
pal-I-R-C-(SBut)-Hyp-NH ₂	OK	OK
pal-I-R-C(SBut)-P-NH ₂	OK	OK
Pgl(OH)-I-R-L-NH ₂	OK	OK
Ph-C(NOCH ₂ Ph)-CO-I-R-NH ₂	OK	OK
Ph-CH=CH-CO-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
Ph-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -CO-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
Ph-CH ₂ CH ₂ -CO-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
Pth-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
S-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)F(pNH ₂)-Chg-R-NH ₂	OK	OK

Tfa-(iBu)F(pNH ₂)-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)Nal(2) -Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)Y-Chg-R-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)Y-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)Y-I-Dab(N ^γ -C ₃ H ₇ N)-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)Y-I-Orn(N ^δ -C ₃ H ₇ N)-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)Y-I-PalMe(3)-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)Y-I-R-OH	OK	OK
Tfa-(iBu)Y-I-R-G-NH ₂	OK	OK
Tfa-(iBu)Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-(Me)Y-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
Tfa-Y(Me)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-Y-Chg-R-NH ₂	OK	OK
Tfa-Y-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Tfa-Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
T-F-G-Y-I-R-K-A-NH ₂	OK	OK
Tos-Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Tos-G-I-R-NH ₂	OK	OK
Tyr(Me)-I-R-L-A-W-L-R-NH ₂	OK	OK
W-F-R-E-M-G-G-G-G-W-L-R-NH ₂	OK	OK
W-I-R-E-K-NH ₂	OK	OK
W-I-R-N-P-NH ₂	OK	OK
W-I-R-T-P-NH ₂	OK	OK
w-L-R-L-A-NH ₂	OK	OK
W-L-R-L-A-NH ₂	OK	OK
W-L-R-L-A-G-G-G-G-NH ₂	OK	OK
W-L-R-V-A-NH ₂	OK	OK
w-L-R-V-A-NH ₂	OK	OK
W-L-R-V-A-G-G-G-G-NH ₂	OK	OK

y(Me)-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
y-Chg-R-NH ₂	OK	OK
y-Chg-R-L-NH ₂	OK	OK
y-Chg-R-L-P-NH ₂	OK	OK
y-Tle-R-Nle-P-NH ₂	OK	OK
y-Tle-R-Nle- Δ^2 P-NH ₂	OK	OK
Y-I-(nR)-L-A-NH ₂	OK	OK
y-I-R-(COCH ₂)-G-P-NH ₂	OK	OK
y-I-R-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-E-F-S-D-Y-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-G-A-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-I-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-I-Y-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-I-Y-E-R-E-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-L-NH ₂	OK	OK
y-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
y-I-R-L-a-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-L-A-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-L-A-A-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-L-A-A-F-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-L-A-A-F-T-NH ₂	OK	OK
y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-L-P-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-L-P-G-L-L-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-L-T-K-M-W-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-L-M-E-M-T-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-V-A-Q-L-Y-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-V-M-N-H-R-NH ₂	OK	OK
Y-I-R-Y-R-N-P-I-NH ₂	OK	OK
Y-R-Y-P-R-D-R-N-NH ₂	OK	OK

Y-L-R-F-P-NH₂

OK

OK

* MS, masių spektrometrija; AA, aminorūgščių analizė.

** - pabraukta ciklinė peptido dalis.

5

XXXVII PAVYZDYS

Kai kurių išgrynintų krešėjimo fermentų ir kitų serino proteazių
inhibavimas *in vitro*

Išradimo junginio sugebėjimas inhibuoti Faktorių Xa, trombiną,
10 plazminą, elastazę ir tripsiną įvertintas nustatant YIR peptido
koncentraciją, kuriai esant fermento aktyvumas inhibuojamas 50 %
(IC₅₀). Išgryninti fermentai naudoti chromogeninėje analizėje. Norint
nustatyti inhibicijos konstantą, IC₅₀ dydžiui įvedama pataisa dėl
konkurencijos su substratu, panaudojant formulę:

15
$$K_i = IC_{50} \times \left(1 + \frac{(\text{substrato koncentracija})}{(\text{substrato } K_m)} \right)$$

(Chen ir Prusoff, Biochem. Pharmacol. 22:3099-3018 (1973),
kuris čia cituojamas).

a. Faktoriaus Xa analizė

Šioje analizėje naudojama TBS-P buferis (50 mM Tris-Cl, pH
20 7,8, 200mM NaCl, 0,05 % (svoris/tūris) PEG-8000, 0,02 % (svoris/tūris)
NaN₃). IC₅₀ nustatomas supilant į atitinkamas duobutes Costar
mikrotitravimo plokštelėje 25 μl žmogaus Faktoriaus Xa (Enzyme
Research Laboratories, Inc.; South Bend IN) TBS-P buferyje; 40 μl
10% (tūris/tūris) DMSO TBS-P buferyje (neinhibuojamas kontrolinis
25 pavyzdys) arba įvairias tiriamo peptido koncentracijas, praskiestas 10 %
(tūris/tūris) DMSO TBS-P buferyje; ir substratą S-2765 (Nα-
benziloksikarbonil-D-Arg-Gly-L-Arg-p-nitroanilidą; Kabi Pharmacia,
Inc.; Franklin OH) TBS-P buferyje.

Prieš analizę peptido inhibitorius inkubuojamas su fermentu 10 min., tada reakcija inicijuojama pridedant tiek substrato, kad bendras tūris būtų 100 μ l. Chromogeninio substrato hidrolizės pradinis greitis matuojamas iš absorbcijos ties 405 nm, naudojant Bio-tek Instruments kinetikos priedėlį (Ceres 900HDI) 25 °C temperatūroje tiesialinijinėje kreivės priklausomybės nuo laiko dalyje (paprastai iki 1-5 min. po substrato pridėjimo). Inhibitoriaus koncentracija, kuri sąlygotų substrato hidrolizės greičio sumažėjimą 50 %, nustatoma iš linijinės regresijos, atidėjus santykinio reakcijos greičio (lyginant su neinhibuojamu kontroliniu pavyzdžiu) priklausomybę nuo peptido koncentracijos logaritmo. Fermento koncentracija yra 0,5 nM , substrato koncentracija 140 μ M.

b. Trombino analizė

Naudojamas TBS-P buferis. IC_{50} nustatoma taip, kaip aprašyta XXXVII.a pavyzdyje, išskyrus tai, kad substratas yra S-2366 (L-PyroGlu-L-Pro-L-Arg-p-nitroanilidas; Kabi), o fermentas - žmogaus trombinas (Enzyme Research Laboratories, Inc.; South Bend IN). Fermento koncentracija yra 1 nM, substrato koncentracija 175 μ M.

c. Plazmino analizė

Naudojamas TBS-P buferis. IC_{50} nustatoma taip, kaip aprašyta XXXVII.a pavyzdyje, išskyrus tai, kad substratas yra S-2251 ((D)-Val-L-Leu-L-Lys-p-nitroanilidas; Kabi), o fermentas - žmogaus plazminas (Kabi). Fermento koncentracija 5 nM, o substrato koncentracija 300 μ M.

d. Tripsino analizė

Naudojamas TBS-P buferis, turintis 10 mM $CaCl_2$. IC_{50} nustatoma taip, kaip aprašyta XXXVII.a pavyzdyje, išskyrus tai, kad substratas yra BAPNA (benzoyl-L-Arg-p-nitroanilidas; Sigma Chemical Co.; St. Louis MO), o fermentas - jaučio kasos tripsinas (tipas XIII, paveiktas TPCK; Sigma). Fermento koncentracija 50 nM, substrato koncentracija 300 μ M.

e. Elastazės analizė

Naudojamas Tris-Cl buferis, pH 7,4, turintis 300 mM NaCl, 2 % (tūris/tūris) N-metilpirolidono, 0,01 % (svoris/tūris) NaN_3 . IC_{50} nustatoma taip, kaip aprašyta XXXVII.a pavyzdyje, išskyrus tai, kad substratas yra sukcinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilidas (Calbiochem-Nova Biochem Corp.; San Diego CA), fermentas - žmogaus neutrofilų elastazė (Athens Research and Tecnology, Inc.; Athens GA). Fermento koncentracija 75 nM, substrato koncentracija 600 μM .

Parinktų tiriamų junginių K_i dydžiai, palyginus su kontroliniu junginiu "TENSTOP" (N- α -tozil-Gly-p-amidinofenilalanino metilo esteris; American Diagnostica, Inc.; Greenwich CT), kuris yra grįžtamas Faktoriaus Xa inhibitorius (Sturzebecher et al., Thromb. Res. 54:245-252 (1989); Hauptman et al., Thromb. Haem. 63:220-223 (1990), kurie čia cituojami) pateikti 2 lentelėje, aukščiau. Rezultatai rodo, kad išradimo YIR peptidai inhibuoja Faktoriaus Xa aktyvumą, bet žymiau neinhibuoja įvairių kitų serino proteazių, įskaitant trombiną ir plazminą, kurie dalyvauja kraujo krešėjimo ir fibrinolizės procesuose, aktyvumo.

XXXVIII PAVYZDYS

Krešėjimo inhibavimo nustatymas

Išradimo junginiai įvertinti pagal tai, kaip jie inhibuoja Faktoriaus Xa aktyvumą. Įvairių junginių efektyvumas įvertintas pagal protrombino laiko (PT) analizę *in vitro*, naudojant apjungtą donorų (žmonių) plazmą. Taip pat naudota *ex vivo* metodika, pagal kurią plazma būdavo paimama praėjus įvairiems laiko tarpams po to, kai junginys intraveniniu būdu įvedamas žiurkėms ir triušiams arba intraduodenaliai žiurkėms, ir atliekama PT analizė, siekiant nustatyti skilimo plazmoje pusperiodį. PT analizė inicijuojama praskiedžiant tromboplastinu, kad gautų išplėstą ir atsikartojančią krešėjimo pabaigą,

vadinama "praskiesto PT analizė" aprašyta žemiau. Įvairių junginių efektyvumas taip pat nustatytas naudojant trombozės arterioveninio šuntavimo modelį žiurkėms *in vivo*.

5 a. Praskiesto protrombino laiko analizė *in vitro*.

Į fibrometro (Baxter Diagnostics., Inc., McGaw Park IL) indelį įpilama 100 µl pašildytos (37 °C) apjungtos žmonių plazmos, beveik neturinčios trombocitų (PPP). Pridedama 50 µl tiriamo junginio įvairios koncentracijos tirpalo TBS-BSA buferyje su kalciu (50 mM Tris-Cl, 100
10 mM NaCl, 0,1 % (svoris/tūris) jaučio serumo albumino, 20 mM CaCl₂). Kontroliniame eksperimente pridedama TBS-BSA su kalciu be tiriamo junginio ir išmatuojamas neinhibuoto krešėjimo laikas. Į fibrometro indelį pridedama 150 µl praskiesto pašildyto triušio tromboplastino (Baxter) su kalciu ir paleidžiamas fibrometro taimeris. Triušio
15 tromboplastino praskiedimo kreivė gaunama prieš junginio tyrimą ir naudojama parinkti tokį praskiedimą, kad neinhibuotame kontroliniame bandyme PT laikas būtų apie 30 s. Eksperimentinė koncentracija, duodanti krešėjimo inhibavimą 50 %, apskaičiuojama iš praskiedimo kreivės laikų.

20 Arba praskiesto protrombinolaiko analizė atliekama naudojant "tyrimo" režimą Instrumentation Laboratories (IL) ACL3000-plus automatiniam krešėjimo instrumente (IL; Milan, Italija). Tromboplastinas skiedžiamas, kol gaunamas 30-35 sekundžių krešėjimo laikas. Šis krešėjimo laikas laikomas 100 % aktyvumu. Standartinė
25 kalibracijos kreivė gaunama keletą kartų skiedžiant du kartus praskiestą tromboplastino reagentą (triušio smegenų IL-markės tromboplastinas). Analizės metu 50 µl pavyzdžio (plazma atskirta centrifūguojant) sumaišoma su 100 µl tromboplastino reagento ir nefelometriniai parodymai užrašomi kas 169 s. Krešėjimo laikas nustatomas iš

maksimalaus šviesos išbarstymo pokyčio greičio. Inhibavimas išreiškiamas procentiniu aktyvumu, lyginant su kalibracine kreive.

b. Praskiesto protrombino laiko analizė *ex vivo*.

5 Tiriamas junginys įvedamas intraveniškai arba į uodegos veną (žiurkėms), arba į ausies veną (triušiams) pagal aprobuotą protokolą. Vieno ml kraujo mėginiai paimami kas tam tikrą laiką po tiriamo junginio įvedimo iš miego arterijos (žiurkėms) arba iš ausies arterijos (triušiams). Centrifuguojama, kad gautų PPP, ir plazma iš karto
10 padedama ant ledo arba užšaldoma.

Praskiesto protrombino laiko nustatymui plazma pašildoma ir analizuojama kaip aprašyta aukščiau. Procentinis inhibavimas apskaičiuojamas iš tromboplastino praskiedimo kreivės, kuri gaunama kiekvienoje pavyzdžių serijoje ir naudojama nustatyti laikui, per kurį
15 plazmoje išlieka apytikriai 50 % pradinio antikoaguliacinio aktyvumo ($T_{1/2}$). Šio eksperimento rezultatai rodo, kad išradimo YIR peptidai inhibuoja kraujo krešėjimą *in vitro* ir *in vivo* (žiūr. 4 lentelę).

4 lentelė. Parinktų inhibitorių aktyvumai ir skilimo pusperiodžiai

20

Struktūra	EC ₅₀	T _{1/2}	
	Apjungta žmogaus plazma, <i>in vitro</i>	Žiurkė, <i>ex vivo</i>	Triušis, <i>ex vivo</i>
Ac-Y-Chg-R-NH ₂	2,5 μM	5 min.	5 min.
Ac-Y-Chg-R-L-P-NH ₂	225 nM	5 min.	5 min.
Ac-Nal(2)-Chg-R-L-P-NH ₂	140 nM	6 min.	5 min.
Tfa-(iBu)Y-Chg-R-L-P-NH ₂	300 nM	15 min.	10 min.

Įvairių junginių antikoaguliacinis aktyvumas, įvedus juos įvairiomis dozėmis žiurkėms baliuso pavidale taip pat buvo ištirtas naudojant praskiesto protrombino laiko analizę *ex vivo*. Junginiai, išvardinti 5 lentelėje, rodė mažiausiai 30 % inhibavimą po 10 min. įvedus ≤ 2 mg/kg tiriamo junginio. Šie rezultatai rodo, kad įvairūs išradimo YIR peptidai turi žymų antikoaguliacinį aktyvumą. Visų junginių, išvardintų 5 lentelėje, struktūra patvirtinta MS ir AA.

5 lentelė.

1. Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-CH₂Chx
2. Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-2CMT
3. Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-Chx
4. Ac-F(pNH₂)-Chg-Dab(N γ -C₃H₇)L-P-NH₂
5. Bz-F(pNH₂)-Chg-R-L-P-NH₂
6. Tos-F(pNH₂)- Chg-R-L-P-NH₂
7. Ac-Y(3-I)- Chg-R-L-P-NH₂
8. Ac-pAph-Chg-AMP(4)
9. y-Chg-R-L-NH₂
10. Ac-F(pNH₂)-Chg-R-ol
11. Ciklopentil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
12. 3-Iqc- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
13. Bzf- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
14. 3-Iqc-F(pNH₂)-Chg-R-L-P-NH₂
15. Ac-F(pNH₂)-Chg-R-tiazolil
16. 2-furoil-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
17. 5-Me-tienil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
18. Ac-Nal(2)-Chg-R-tiazolil
19. 2-Bzf-f(pNH₂) -Chg-R-L-P-NH₂
20. Ac-pAph-Chg-Dab(N γ -C₃H₇)-L-P-NH₂
21. Ac-Orn-Nal(2)-Chq-PalMe(3)-Sar-E-NH₂*

22. Ac-Phe(3-I,4-NH₂)-Chg-R-L-P-NH₂
23. Ac-(iBu)pAph- Chg-R-L-P- NH₂
24. Ac-pAph-Chg-R-Gla-P- NH₂
25. Ac-pAph-Chg-R-Pen(CH₂COOH)-P- NH₂
26. Ac-pAph-Chg-R-L-P-NH₂
27. Ac-F(pNH₂)-Chg-R-(Me)L-P-NH₂
28. Ac- F(pNH₂)- Chg-R-OEt
29. Ac-F(pNH₂)-Chg-Orn(N^δ-C₃H₇N)-L-P-NH₂
30. Ac-F(pNH₂)- Chg-R-L-P- NH₂
31. Ac-Nal(2)Chg-R-L-P-NH₂
32. Ac-pAph-Chg-Dab(N^γ-C₃H₇)
33. Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
34. Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-L-P-NH₂
35. Ac-pAph-Chg-R-NH₂
36. Ac-pAph-Chg-R-OH
37. Ac-Y-Chg-R-NH-Nip-NH₂
38. Ac-K-Nal(2)-Chg-R-Hyp-E-NH₂
39. DIPA-pAph- Chg-R-L-P- NH₂
40. DIPAmF(pNH₂)-Chg-R-L-P- NH₂
41. Isn-F(pNH₂)-Chg-R-L-P- NH₂
42. Pza-F(NH₂)- Chg-R-L-P- NH₂
43. Tfa-(iBu)F(pNH₂)-Chg-R-L-P-NH₂
44. Tfa-(iBu)Y-Chg-R-L-P-NH₂
45. Tfa-(iBu)Y-I-Orn-(N^δ-C₃H₇N)-L-P-NH₂

* - pabraukta ciklinė peptido dalis

5

Kai kuriuose eksperimentuose tiriami junginiai buvo įvedami žiurkėms intraduodenaliai. Sprague-Dawley žiurkių patinėliai, sveriantys apie 300 g, anestezuojami po oda ketamino - ksilazino mišiniu pagal aprobuotą protokolą. Į kairiąją miego arteriją įvedamos

kaniulės kraujo paėmimui. Atliekama laparotomija ir į dvylikapirštę žarną įvedamas adatos pavidalo kateteris su rezervuaru ir įtvirtinamas taip, kad siūlė būtų į išorę nuo įtvirtinimo. Dar vienas raištis perrišamas proksimaliai, kad išvengtų skrandžio turinio pratekėjimo. Siūlės efektyvumas nepraleidžiant junginio iki įtvirtinimo vietos kiekviename eksperimente išbandomas slėgiu. Įtvirtinimo vieta buvo apie 4 cm nuo dvylikapirštės žarnos-skrandžio jungties. Junginiai įvedami 1ml fiziologiniame tirpale. 0,7 ml kraujo mėginiai paimami prieš įvedant tiriamą junginį ir praėjus 15, 30, 60, 90, 120 min. po įvedimo. Plazma atskiriama centrifūguojant ir tiramas kraujo krešėjimo inhibavimas pagal praskiesto protrombino laiko metodiką. Šie junginiai, įvedus jų dozę ≤ 50 mg/kg intraduodenaliai, rodė mažiausiai 30 % inhibavimą pagal praskiesto protrombino laiko analizės duomenis:

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-CH₂-Chx;
 15 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH -Chx;
 Bzf-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 Ac-F(pNH₂)-Chg-R-L-P-NH₂;
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-L-P-NH₂;
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 20 Ac-Aph-Chg-AMP(4);
 Ciklopentil-CO-pAph-Chg-Pal(Me₃)-NH₂;
 3-Iqc-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 2-furoil-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 5-Me-tienil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 25 Ac-Y(3-I)-Chg-R-L-P-NH₂;
 Ac-F(pNH₂)-Chg-R-ol;
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-ol.

c. Žiurkių trombozės arterioveninio šunto modelis
 30 Įvairių išradimo junginių anti-trombinis efektyvumas įvertintas naudojant žiurkėms ekstrakorporinį arterioveninį (AV) šuntą. AV

šunto grandinė susideda iš 20 cm ilgio vamzdelio iš polietileno 60 (PE), įstatyto į dešinę miego arteriją, 6 cm PE 160 vamzdelio, turinčio 6,5 cm ilgio medvilninį siūlą (5 cm išsikišusį iš vamzdelio, kad tekėtų kraujas) ir 20 cm ilgio PE 60 vamzdelį, sujungiantį grandinę per kairiąją kaklo veną.

Tiriami junginiai įvedami nepertraukiamos infuzijos būdu į uodegos veną, naudojant švirkštą ir kateterį (infuzijos tūris 1,02 ml/val.). Junginys leidžiamas 30 min., po to šuntas atidaromas ir kraujui leidžiama tekėti 15 min. (iš viso 45 min. infuzijos). Pasibaigus 15 min. periodui, šuntas suveržiamas ir siūlas atsargiai ištraukiamas ir pasveriamas analitinėmis svarstyklėmis. Procentinis trombų susidarymo inhibavimas apskaičiuojamas panaudojant trombo, gauto kontrolinėse žiurkėse, kurioms buvo leidžiamas fiziologinis tirpalas, svorį.

Žemiau pateikti junginiai inhibavo trombų susidarymą mažiausiai 30 %, įvedus infuzijos būdu jų dozę $\leq 33 \mu\text{g/kg/min.}$:

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-CH₂Chx;
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-Chx;
 Ciklopentil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 3-Iqc- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 Bzf- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 Ac-pAph-Chg-Amp(4);
 2-furoil-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 5-Me-tienil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂;
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-L-P-NH₂;
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-ol;
 Tos-F(pNH₂)-Chg-R-L-P-NH₂.

Nors išradimas aprašytas nurodant atskleistus įgyvendinimus, tos srities specialistas sutiks, kad smulkiai aprašyti specifiniai eksperimentai tik iliustruoja išradimą. Suprantama, kad įmanomos įvairios

modifikacijos, nenukrypstant nuo išradimo dvasios. Atitinkamai, išradimas ribojamas tik pateikiama apibrėžtimi.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

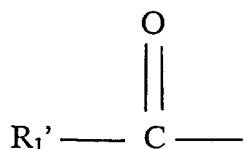
5 1. Junginys, specifiskai inhibuojantis Faktoriaus Xa aktyvumą,
kurio bendra formulė $A1-A2-(A3)_m-B$, kurioje m yra 0 arba 1;

kurioje $A1$ yra $R_1-R_2-R_3$, $A2$ yra $R_4-R_5-R_6$ ir $A3$ yra $R_7-R_8-R_9$;

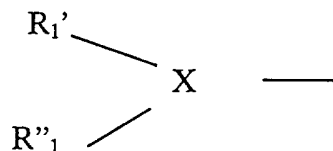
kur R_1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš:

i) 1-20 aminorūgščių;

10 ii)



15 iii)



kurioje X yra parinktas iš grupės, susidedančios iš N , CH ir
20 $NC=O$, ir

kurioje R_1' ir R_1'' nepriklausomai vienas nuo kito yra parinktos iš
grupės, susidedančios iš H , alkilo, acilo, arilo, arilalkilo ir aminogrupę
blokuojančios grupės, ir kurioje R_1 gali turėti pakaitą;

R_2 yra $-CR_{99}R_{100}-$, kur R_{99} ir R_{100} nepriklausomai vienas nuo kito
25 yra parinkti iš grupės, susidedančios iš H , alkilo, arilalkilo,
heteroarilalkilo ir heteroarilo, ir kur R_{99} ir R_{100} nepriklausomai gali
turėti pakaitų,

R_3 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš $-C(O)-$, $-CH_2-$,
30 $-CHR_{99}-C(O)-$ ir $-C(O)-NR_{35}-CH_2-C(O)-$, kurioje R_{35} yra CHR_{55}
grupė, priklausanti tilteliui $-C(O)-CR_{55}-$;

R_4 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš $-\text{CH}_2-$ ir $-\text{NR}_{50}-$, kurioje R_{50} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, arilalkilo ir heterociklo;

5 R_5 yra $-\text{CR}_{201}\text{R}_{202}$, kurioje R_{201} ir R_{202} nepriklausomai yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, arilo, ir arilalkilo, ir kurioje R_{201} ir R_{202} nepriklausomai gali būti pakeisti;

R_6 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2-$ ir $-\text{CHR}_{99}-\text{C}(\text{O})-$;

10 R_7 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš $-\text{CH}_2-$ ir $\text{NR}_{51}-$, kur R_{51} yra H, alkilas, arilalkilas, heteroalkilas ir heteroarilalkilas ir bet kuri iš šių grupių turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš Q ir $-(\text{CH}_2)_n-\text{Q}$, kur n yra nuo 1 iki 5 ir Q yra parinktas iš grupės, susidedančios iš amino, amidino, imidazolo ir guanidino grupių, kurios gali būti pakeistos, ir jų farmaciškai priimtinos mono-, di-, tri- ar tetra-

15 amonio druskos, izoureidai ar izotioureidai;

R_8 yra $-\text{CR}_{210}\text{R}_{211}-$, kurioje R_{210} ir R_{211} nepriklausomai vienas nuo kito yra parinkti iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, alkilarilo ir heterociklo, o bet kuris iš jų turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš Q ir $-(\text{CH}_2)_n-\text{Q}$, kur n yra nuo 1 iki 5 ir Q yra

20 parinktas iš grupės, susidedančios iš amino, amidino, imidazolo ir guanidino grupių, kurios gali turėti pakaitą, ir jų farmaciškai priimtinių mono-, di-, tri- ir tetra-amonio druskų, izoureidų ar izotioureidų;

R_9 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2-$ ir $-\text{CHR}_{99}-\text{C}(\text{O})-$; ir

25 kurioje, kai m yra 1, B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš 1-20 aminorūgščių, $-\text{NHR}_{52}$, $-\text{NR}_{60}\text{R}_{61}$, $-\text{OR}_{70}$ ir $-\text{CHR}_{60}\text{R}_{61}$,

kurioje R_{52} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, arilalkilo, heteroarilalkilo ir heteroarilo; kurioje

30 R_{60} ir R_{61} nepriklausomai vienas nuo kito yra parinkti iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, arilalkilo, arilo, heteroarilalkilo ir heteroarilo, ir

kurioje R_{70} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, acilo, alkilo, arilalkilo ir heteroarilalkilo,

ir kurioje, kai m yra 0, B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš 1-20 aminorūgščių, $-OR_{70}$, $-NHR_{52}$ ir $-NR_{60}R_{61}$, kurie yra prijungti prie R_6 amidiniu arba esteriniu ryšiu;

kurioje B gali būti pakeistas,

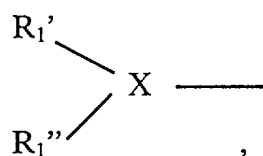
su sąlyga, kad, kai R_3 yra $-\text{CH}_2-$ ar $-\text{CHR}_{99}-\text{C}(\text{O})-$, R_4 yra NR_{50} ;

kai R_4 yra $-\text{CH}_2-$, R_3 yra $-\text{C}(\text{O})-$ arba $-\text{CHR}_{99}-\text{C}(\text{O})-$;

kai R_6 yra $-\text{CH}_2-$, R_7 yra $-\text{NHR}_{51}-$;

kai R_7 yra CH_2 , R_6 yra $-\text{C}(\text{O})-$ arba $-\text{CHR}_{99}-\text{C}(\text{O})-$;

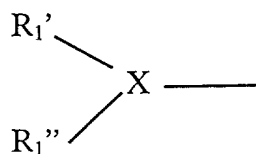
kai R_4 yra $-\text{NR}_{50}-$ ir R_1 yra



R_{50} ir R_1' paimti kartu, sudaro formulės $-\text{C}(\text{O})\text{CHR}_{55}-$ tiltelį, kuriame R_1' reiškia $\text{C}(\text{O})$ ir R_{35} reiškia CHR_{55} ;

R_1'' ir R_{55} nepriklausomai yra H, C_1-C_6 alkilas arba arilalkilas;

ir kai R_3 yra $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_{35}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$, R_4 yra $-\text{NR}_{50}-$, R_1 yra

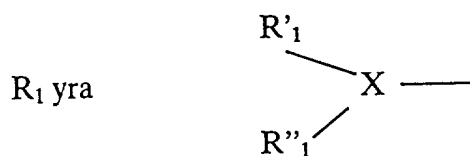


R_{35} ir R_1' , paimti kartu, sudaro formulės $-\text{C}(\text{O})-\text{CHR}_{55}$ tiltelį,

kuriame $\text{C}(\text{O})$ atitinka R_1' , o CHR_{55} atitinka R_{35} ; R_1'' ir R_{55} nepriklausomai vienas nuo kito yra H arba C_1-C_6 -alkilas.

2. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad

R_4 yra $-\text{NR}_{50}-$,



- 5 R₅₀ ir R'₁, paimti kartu, sudaro formulės -C(O)-CHR₅₅ tiltelį, kuriame R₅₅ yra H;
R₁ yra H arba metilas;
R₉₉ ir R₁₀₀ nepriklausomai yra parinkti iš grupės, susidedančios iš H, arilalkilo, alkilo ir heteroalkilo, arba nuo 1 iki 3 anglies atomų,
10 ir kurioje R₉₉ ir R₁₀₀ savo ruožtu gali būti prijungti prie struktūrinio vieneto, parinkto iš grupės, susidedančios iš fenilo, tienilo, tiazolilo, piridilo, naftilo, tionaftilo, indolilo arba sotaus alkilo, alkoksilo, monoalkilamino, dialkilamino, tetraalkilamonio, arilalkilamino, aminoalkilarilo, karboksilo, halogeno, hidroksilo, amino,
15 amido, amidino, guanidino, triazolilo ir sulfonilo,
ir R₃ yra parinktas iš grupės, susidedančios iš -C(O)- ir -C(O)-NR₃₅-CH₂-C(O)-.

3. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi tiltelį tarp dviejų struktūrinių vienetų, parinktų iš grupės, susidedančios
20 iš R₁₀ ir R₁, R₉ ir R₁, R₈ ir R₁, R₅ ir R₁, R₅ ir R₂, R₅ ir R₈, R₅ ir R₉,
kur minėtas tiltelis turi struktūrą -CR₄₀₀R₄₁₀(X-Y)-R₅₀₀R₅₁₀C-;
kurioje R₄₀₀, R₄₁₀, R₅₀₀ ir R₅₁₀ yra parinkti iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, cikloalkilo, arilalkilo ir arilo, ir

- X ir Y nepriklausomai vienas nuo kito yra parinkti iš grupės,
25 susidedančios iš anglies, azoto, deguonies, sieros, -CO-NH-, -CH₂-O-CH₂ ir jų funkcinių ekvivalentų; ir

- kurioje R₄₀₀, R₄₁₀, R₅₀₀, R₅₁₀ gali būti pakeisti struktūriniais vienetu, parinktu iš grupės, susidedančios iš alkilo grupės ir heteroatomo.

- 30 4. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R'₁ ir R''₁ nepriklausomai vienas nuo kito turi pakaitus, parinktus iš grupės,

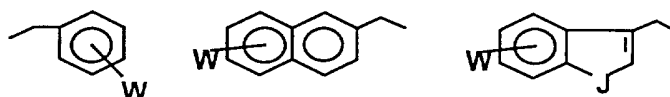
susidedančios iš C_1 - C_6 -alkilo, $-OCH_2-$, $-SCH_2-$, $>N-CH_2-$,
 $>NC(O)-$, $-CO-$ arba $-NY-CO-NZ$,

kur Y ir Z nepriklausomai vienas nuo kito yra parinkti iš grupės, susidedančios iš H, C_1 - C_8 -alkilo, C_5 - C_{12} -arilalkilo arba heteroarilalkilo.

5 Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_2 turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš fenilo, tienilo, tiazolilo, piridilo, naftilo, tionaftilo, indolilo, alkilo, alkoksilo, monoalkilamino, dialkilamino, tetraalkilamonio, arilalkilamino, aminoalkilarilo ir karboksilo.

10 6. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_2 turi nuo 1 iki 5 pakaitų, parinktų iš grupės, susidedančios iš alkilo, alkoksilo, monoalkilamino, dialkilamino, tetraalkilamonio, arilalkilamino, aminoalkilarilo, karboksilo, halogenų, hidroksilo, amino, amido, amidino, guanidino, triazolilo arba sulfonilo.

15 7. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{100} yra H ir R_{99} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš



20 kur W yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, amino, žemesniojo alkilo, pasirinktinai pakeisto aminu, amidu, hidroksilu, karboksilu ir amidino grupe; ir

J yra parinktas iš grupės, susidedančios iš O, S, NH ir NR, kur R yra parinktas iš grupės, susidedančios iš C_1 - C_6 -alkilo, C_5 - C_{12} -arilalkilo,
 25 C_1 - C_6 -alkanoilo ir C_5 - C_{12} -ariloilo.

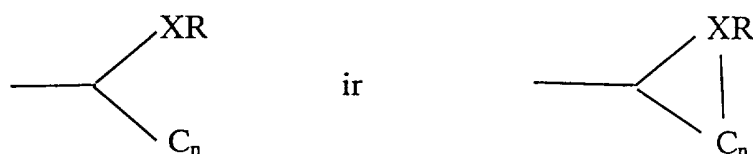
8. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{50} turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš N-, O- ir S-turinčių struktūrų.

9. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{50} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo, arialkilo ir heteroarilalkilo.

5 10. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{201} ir R_{202} turi pakaitus, parinktus iš grupės, susidedančios iš N-, O- ir S-turinčių struktūrų.

11. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{202} yra H, o R_{201} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš

10



15

kur X yra C, N arba S; R yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H ir alkilo, kuris gali būti pakeistas heteroatomu, ir n yra 1-5.

12. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{51} turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš N-, O- ir S-turinčių struktūrų

20

13. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{210} ar R_{211} turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš Q ir $(CH_2)_n-Q$, kur n yra 1-5.

14. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{52} turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš N-, O- ir S-turinčių struktūrų.

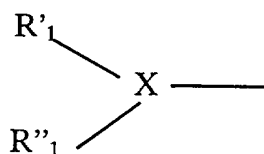
25

15. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{60} ir R_{61} nepriklausomai vienas nuo kito yra pakeisti alkilu.

16. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_{70} yra pakeistas alkilu.

30

17. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R_1 yra



5 R'_1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, $-\text{CO}-\text{R}_a$, $-\text{SO}_2-\text{R}_a$, aminogrupę blokuojančios grupės, 1-6 aminorūgščių, kurios gali būti pakeistos, kur minėtų 1-6 aminorūgščių N-galas turi pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš H, $-\text{CO}-\text{R}_a$, $-\text{SO}_2-\text{R}_a$ ir aminogrupę blokuojančios grupės; ir

10 kur R_a yra parinktas iš grupės, susidedančios iš alkilo, arilo ir heteroalkilo;

R''_1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, acilo ir alkilo;

X yra N;

15 R_2 yra $-\text{CHR}_{99}-$, kur R_{99} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš alkilo, arilo, arilalkilo, heteroalkilo ir heteroarilo, kurie gali turėti pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš 1-6 fluoro, chloro, bromo, jodo, amino, nitro, amidino, amido, karboksilo, esterio, eterio ir hidroksilo grupių;

R_3 yra $-\text{C}(\text{O})-$;

20 R_4 yra $-\text{NH}-$;

R_5 yra $-\text{CHR}_{201}-$, kur R_{201} yra alkilas;

R_6 yra $-\text{C}(\text{O})-$;

R_7 yra $-\text{NH}-$;

25 R_8 yra $-\text{CHR}_{210}-$, kur R_{210} yra heteroalkilas, turintis bent vieną formaliai teigiamą krūvį, kur heteroatomas yra 1-6 azoto atomai;

R_9 yra $-\text{C}(\text{O})-$; ir

B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš $-\text{OR}_b$ ir $-\text{N}-\text{R}_c\text{R}_d$,

kur R_b yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo ir karboksilą blokuojančios grupės,

30 R_c yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H ir alkilo, ir

R_d yra parinktas iš grupės, susidedančios iš alkilo, heteroalkilo ir 1-20 aminorūgščių, kurie gali turėti pakaitą,

kur minimo junginio C-galas gali būti modifikuotas karboksilą blokuojančia grupe, pirminio amido grupe arba dalimi ciklinio peptido, turinčia pavidalą antrinės arba tretinės amido grupės, sudarytos su R_1 aminogrupe.

18. Junginys pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad A_1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Tyr, F(pNH₂), mAph, pAph ir Nal(2).

19. Junginys pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi aminogrupę blokuojančią grupę.

20. Junginys pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad A_2 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Ile ir Chg.

21. Junginys pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad A_3 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Arg, PalMe(3), Dab(N^γ-C₃H₇N), Dap(N^β-C₃H₇N) ir Orn(N^δ-C₃H₇N).

22. Junginys pagal 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad A_1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Tyr, F(pNH₂), mAph, pAph ir Nal(2), kurie turi 0 arba 1 aminogrupę blokuojančią grupę;

A_2 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Ile ir Chg;

A_3 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Arg, PalMe(3), Dab(N^γ-C₃H₇N), Dap(N^β-C₃H₇N) ir Orn(N^δ-C₃H₇N); ir

B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš -H, -OH, -NH₂, 1-5 aminorūgščių arba jų funkcinių ekvivalentų ir karboksilą blokuojančios grupės.

23. Junginys pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra parinktas iš grupės, susidedančios iš:

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-CH₂Chx

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-2CMT

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-Chx

Ac-F(pNH₂)-Chg-Dab(N^γ-C₃H₇)L-P-NH₂
 Bz-F(pNH₂)-Chg-R-L-P-NH₂
 Tos-F(pNH₂)- Chg-R-L-P-NH₂
 Ac-Y(3-I)- Chg-R-L-P-NH₂
 y-Chg-R-L-NH₂
 Ac-F(pNH₂)-Chg-R-ol
 Ciklopentil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 3-Iqc- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 Bzf- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 3-Iqc-F(pNH₂)-Chg-R-L-P-NH₂
 Ac-F(pNH₂)-Chg-R-tiazolil
 2-furoil-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 5-Me-tienil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 Ac-Nal(2)-Chg-R-tiazolil
 2-Bzf-f(pNH₂) -Chg-R-L-P-NH₂
 Ac-pAph-Chg-Dab(N^γ-C₃H₇)-L-P-NH₂
 Ac-(iBu)pAph- Chg-R-L-P- NH₂
 Ac-pAph-Chg-R-Gla-P- NH₂
 Ac-pAph-Chg-R-Pen(CH₂COOH)-P- NH₂
 Ac-pAph-Chg-R-L-P-NH₂
 Ac-F(pNH₂)-Chg-R-(Me)L-P-NH₂
 Ac- F(pNH₂)- Chg-R-OEt
 Ac-F(pNH₂)-Chg-Orn(N^δ-C₃H₇N)-L-P-NH₂
 Ac-F(pNH₂)- Chg-R-L-P- NH₂
 Ac-Nal(2)Chg-R-L-P-NH₂
 Ac-pAph-Chg-Dab(N^γ-C₃H₇)
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-L-P-NH₂
 Ac-pAph-Chg-R-NH₂
 Ac-pAph-Chg-R-OH
 Ac-pAph-Chg-R-OH

DIPA-pAph- Chg-R-L-P- NH₂
 DIPAmF(pNH₂)-Chg-R-L-P- NH₂
 Isn-F(pNH₂)-Chg-R-L-P- NH₂
 Pza-F(NH₂)- Chg-R-L-P- NH₂
 Tfa-(iBu)Y-Chg-R-L-P-NH₂
 Tfa-(iBu)Y-I-Orn-(N^δ-C₃H₇N)-L-P-NH₂

24. Junginys pagal 22 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra parinktas iš grupės, susidedančios iš:

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-CH₂Chx
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-Chx
 Ciklopentil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 3-Iqc- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 Bzf- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 2-furoil-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 5-Me-tienil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-L-P-NH₂
 Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-ol.

25. Junginys pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad m yra 0.

5 26. Junginys pagal 25 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad B yra heteroarilalkilas.

27. Junginys pagal 26 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas heteroarilalkilas yra parinktas iš grupės, susidedančios iš:

10 (4-(N-metilpiridinium)metil;
 2-(3-(N-metilpiridinium))et-1-il;
 1-(4-(N-metilpiridinium)et-1-il;
 (p-amidino)benzil;
 2-(4-(N-metilpiridinium)prop-2-il; ir
 2-(4-(N-metilpiridinium))et-1-il.

28. Junginys pagal 26 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra parinktas iš grupės, susidedančios iš:

Ac-pAph-Chg-AMP(4) ir

Ac-pAph-Chg-AEMP(4).

5 29. Ne gamtoje randamas junginys, specifiskai inhibuojantis Faktoriaus Xa aktyvumą, kurio bendra formulė yra X_1 -YIR- X_2 ,

kurioje X_1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, acilo, alkilo, acilalkilo, arilalkilo ir 1-20 aminorūgščių, ir

10 X_2 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš modifikuotos C-galinės grupės, vienos arba kelių karboksigrupę blokuojančių grupių ir 1-20 aminorūgščių,

kur minėtas junginys gali turėti pakaitą.

15 30. Junginys pagal 29 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad X_1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, 1 aminorūgšties ir 2 aminorūgšties ir X_2 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš modifikuotos C-galinės grupės, vienos arba keleto karboksigrupę blokuojančių grupių ir 1-17 aminorūgščių.

31. Junginys pagal 29 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra tiesios grandinės junginys.

20 32. Junginys pagal 29 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad jis yra ciklinis.

33. Junginys pagal 32 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ciklizacija vyksta per tiltelį, esantį už YIR motyvo ribų.

25 34. Junginys pagal 33 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ciklizacija apima tiltelį su Ile liekana, esančia YIR motyvo viduje.

35. Junginys pagal 29 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad yra parinktas iš grupės, susidedančios iš:

Ac-Tyr-Ile-Arg-Leu-Ala-NH₂;

Ac-Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂;

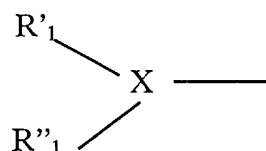
30 Ac-(iBu)Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂;

Ac-Tyr-Ile-Arg-N(CH₃)O(CH₃);

- Ac-Tyr- $\{-\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂;
 Ac-Tyr-Ile-Arg-NH-CH₂(4-piridil);
 Ac-Tyr-Ile- $\{-\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Arg-Leu-Pro-NH₂;
 Ac-Tyr-Chg-Arg(NO₂)- $\{-\Psi(\text{CH}_2\text{NH})\}$ -Leu-NH₂;
 5 Ac-Tyr-Ile-Arg- $\{-\Psi(\text{COCH}_2)\}$ -Gly-Pro-NH₂;
 Ac-Tyr-Ile-Dab(N⁷-C₃H₇N)-Leu-Ala-NH₂;
 Ac-Tyr-Ile-PalMe(3)-NH₂;
 Tyr-Ile-Arg-NH₂;
 D-Tyr-Ile-Arg-Leu-Pro-NH₂;
 10 Ac-(Bzl)Gly-(Chx)Gly-(3-guanidopropil)Gly-NH₂;
 ciklo(Gly-Tyr-Ile-Arg-Gly);
 Tfa-(iBu)Tyr-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂;
 Ac-pAph-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂;
 Ac-Nal(2)-Chg-Arg-Leu-Pro-NH₂;
 15 Ac-pAph-Chg-PalMe-NH₂;
 ir jų farmacijoje priimtinos druskos, amidai, esteriai, alkoholiai ir aldehydai.

36. Faktorius Xa specifinio inhibavimo būdas, b e s i s k i r i a -
 n t i s tuo, kad apima Faktorius Xa sąveikavimą su junginiu pagal 1
 20 punktą.

37. Būdas pagal 36 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad R₁ yra



25 R₁ yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, -CO-R_a, -SO₂-R_a,
 aminogrupę blokuojančios grupės, 1-6 aminorūgščių, kurios gali būti
 pakeistos, kur minėtų 1-6 aminorūgščių N-galas turi pakaitą, parinktą iš
 grupės, susidedančios iš H, -CO-R_a, -SO₂-R_a ir aminogrupę
 blokuojančios grupės; ir

30 kur R_a yra parinktas iš grupės, susidedančios iš alkilo, arilo ir
 heteroalkilo;

R''_1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, acilo ir alkilo;

X yra N;

R_2 yra $-CHR_{99}-$, kur R_{99} yra parinktas iš grupės, susidedančios iš alkilo, arilo, arilalkilo, heteroalkilo ir heteroarilo, kurie gali turėti pakaitą, parinktą iš grupės, susidedančios iš 1-6 fluoro, chloro, bromo, jodo, amino, nitro, amidino, amido, karboksilo, esterio, eterio ir hidroksilo grupių;

R_3 yra $-C(O)-$;

R_4 yra $-NH-$;

R_5 yra $-CHR_{201}-$, kur R_{201} yra alkilas;

R_6 yra $-C(O)-$;

R_7 yra $-NH-$;

R_8 yra $-CHR_{210}-$, kur R_{210} yra heteroalkilas, turintis bent vieną formaliai teigiamą krūvį, kur heteroatomas yra 1-6 azoto atomai;

R_9 yra $-C(O)-$; ir

B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš $-OR_b$ ir $-N-R_cR_d$,

kur R_b yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H, alkilo ir karboksilą blokuojančios grupės,

R_c yra parinktas iš grupės, susidedančios iš H ir alkilo;

R_d yra parinktas iš grupės, susidedančios iš alkilo, heteroalkilo ir 1-20 aminorūgščių, kurie gali turėti pakaitą,

kur minimo junginio C-galas gali būti modifikuotas karboksilą blokuojančia grupe, pirminio amido grupe arba dalimi ciklinio peptido, turinčia pavidalą antrinės arba tretinės amido grupės, sudarytos su R_1 aminogrupe arba redukuojant iki alkoholio.

38. Būdas pagal 37 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad

A1 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Tyr, $F(pNH_2)$, mAph, pAph ir Nal(2), kurie turi 0 arba 1 aminogrupę blokuojančią grupę;

A2 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Ile ir Chg;

A3 yra parinktas iš grupės, susidedančios iš Arg, PalMe(3), Dab(N^γ-C₃H₇N), Dap(N^β-C₃H₇N) ir Orn(N^δ-C₃H₇N); ir

B yra parinktas iš grupės, susidedančios iš -H, -OH, -NH₂, 1-5 aminorūgščių arba jų funkcinių ekvivalentų ir C-galą blokuojančios grupės.

5

39. Būdas pagal 38 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad junginys yra parinktas iš grupės, susidedančios iš :

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-CH₂Chx

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH-Chx

10

Ciklopentil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂

3-Iqc- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂

Bzf- pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂

2-furoil-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂

5-Me-tienil-CO-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂

15

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-NH₂

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-L-P-NH₂

Ac-pAph-Chg-PalMe(3)-ol,

40. Būdas pagal 38 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad junginys yra parinktas iš grupės, susidedančios iš :

20

Ac-Y-I-R-L-A-NH₂,

Ac-Y-I-R-L-P-NH₂,

Ac-(iBu)Y-I-R-L-P-NH₂,

Ac-Y-I-R-N(CH₃)O(CH₃),

Ac-Y- $\{ \Psi(\text{CH}_2\text{NH}) \}$ -I-R-L-P-NH₂,

25

Ac-Y-I-R-NH-CH₂(4-piridil),

Ac-Y-I- $\{ \Psi(\text{CH}_2\text{NH}) \}$ -R-L-P-NH₂,

Ac-Y-Chg-R(NO₂) - $\{ \Psi(\text{CH}_2\text{NH}) \}$ -L-NH₂,

Ac-Y-I-R- $\{ \Psi(\text{COCH}_2) \}$ -G-P-NH₂,

Ac-Y-I-Dab(N^γ-C₃H₇N)-L-A-NH₂,

30

Ac-Y-I-PalMe(3)NH₂,

Y-I-R-NH₂,

D-Y-I-R-L-P-NH₂,

Ac-(Bzl)Gly-(Chx)Gly-(3-guanidopropil)Gly-NH₂,

ciklo(G-Y-I-R-G),

Tfa-(iBu)Y-Chg-R-L-P-NH₂,

5 Ac-pAph-Chg-R-L-P-NH₂,

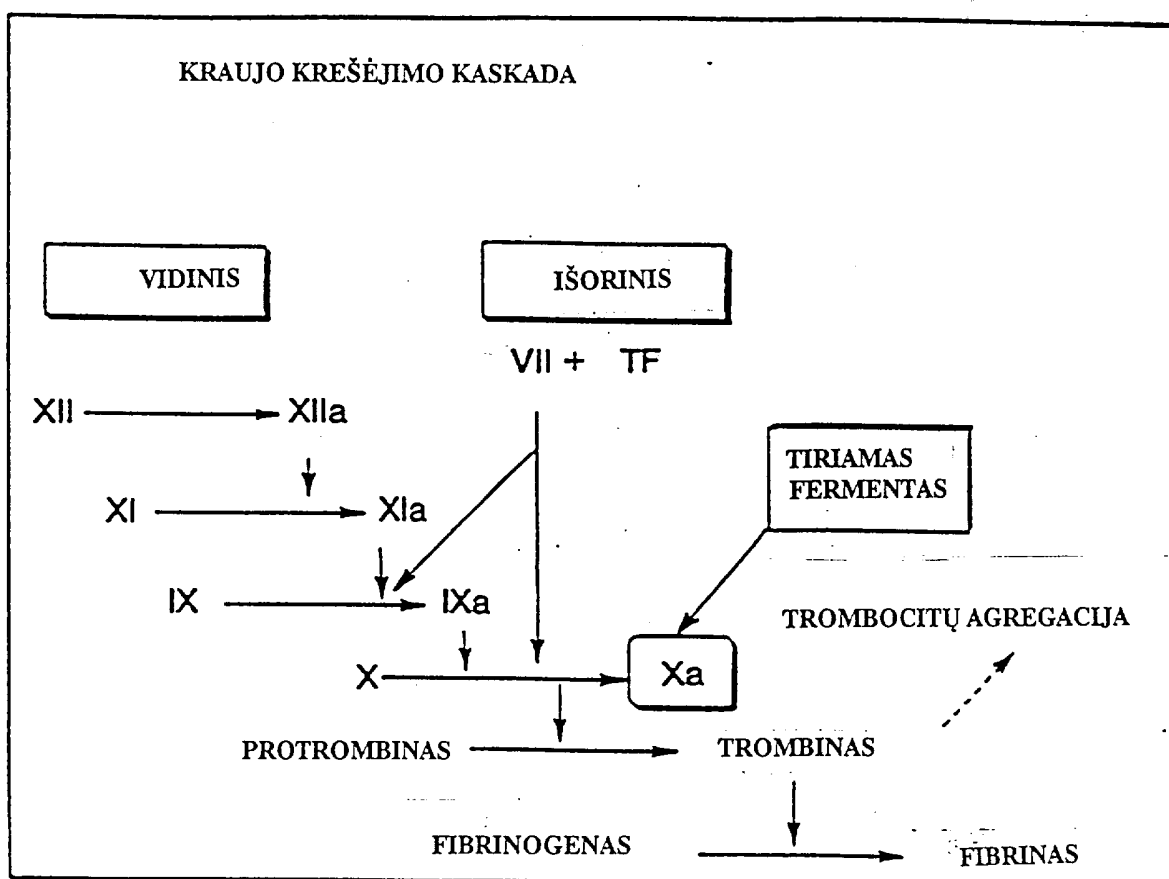
Ac-Nal(2)-Chg-R-L-P-NH₂,

ir jų farmaciškai priimtinos druskos, amidai, esteriai, alkoholiai ir aldehydai.

10 41. Junginys pagal 1 punktą, skirtas kraujo krešėjimo inhibavimui individe.

42. Faktoriaus Xa kiekio mėginyje nustatymo būdas, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad mėginys sąveikauja su junginiu pagal 1 punktą ir nustatomas surišimo kiekis.

15 43. Faktoriaus Xa kiekio mėginyje nustatymo būdas, b e s i s k i - r i a n t i s tuo, kad mėginys sąveikauja su junginiu pagal 1 punktą ir nustatomas Faktoriaus Xa fermentinis aktyvumas.

**FIG. 1**

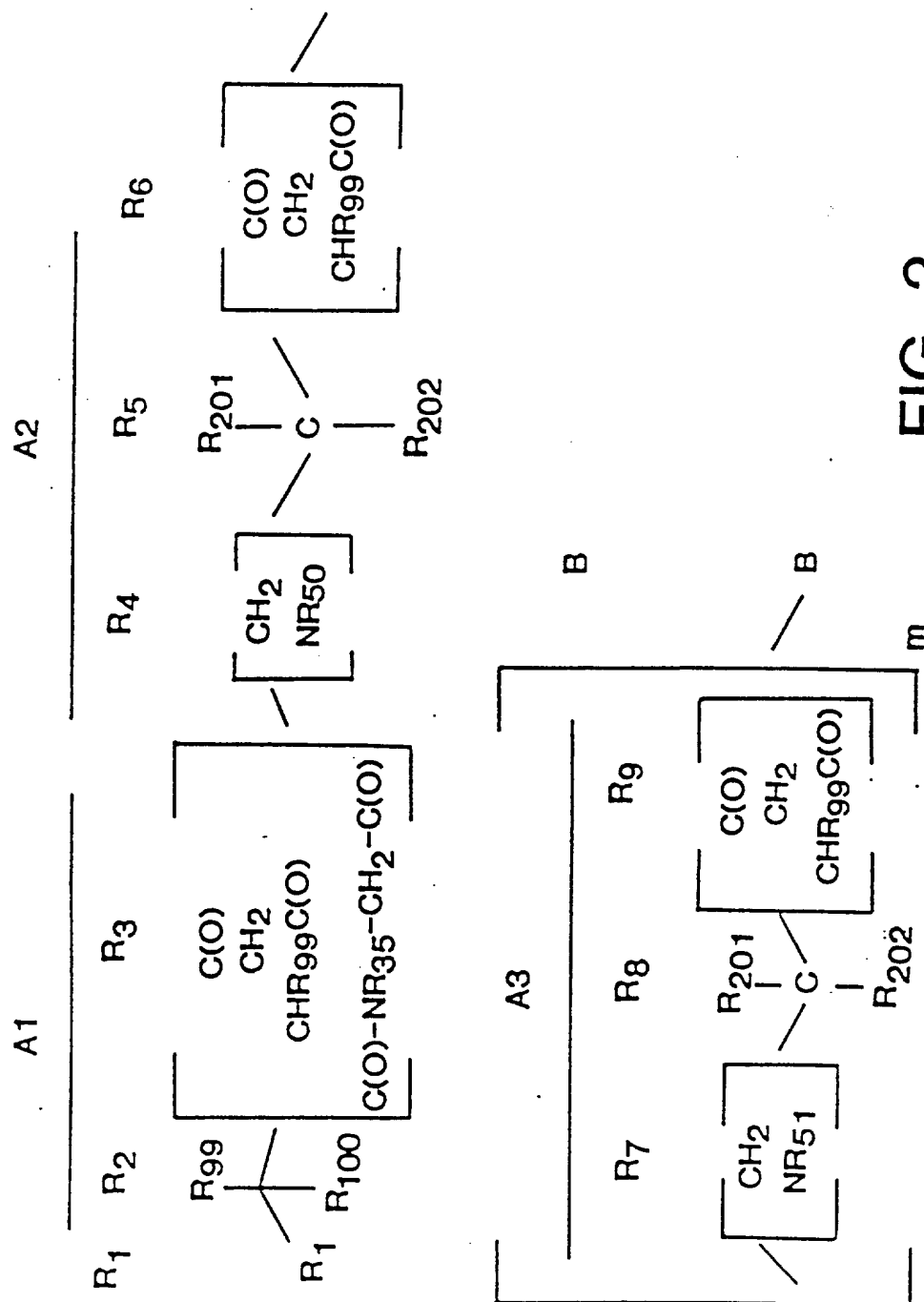
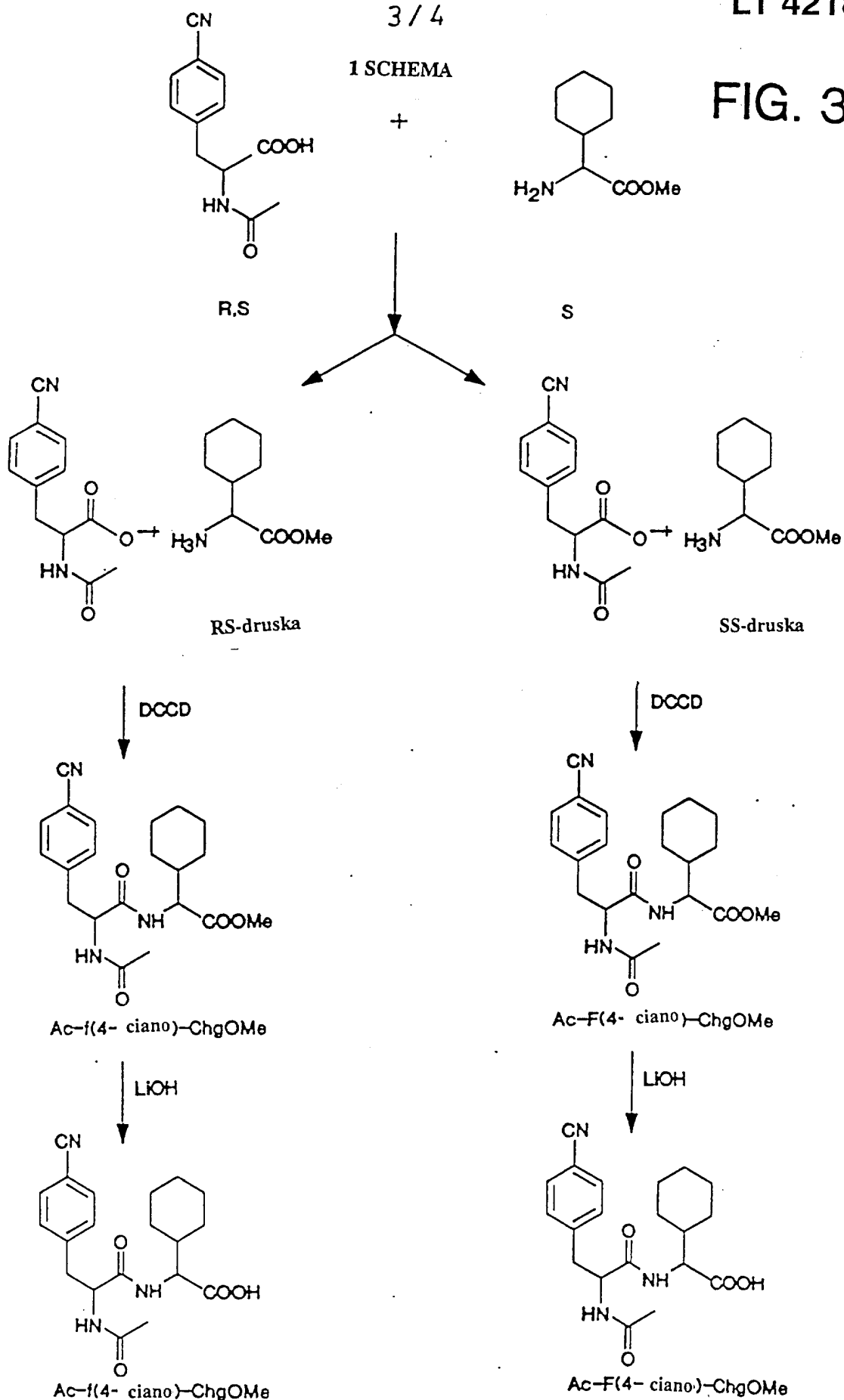


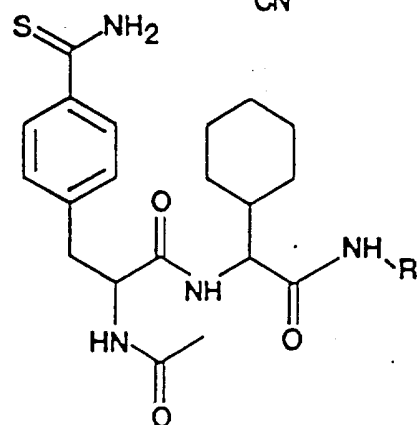
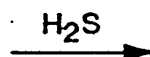
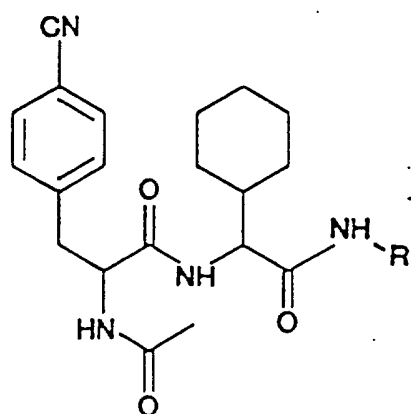
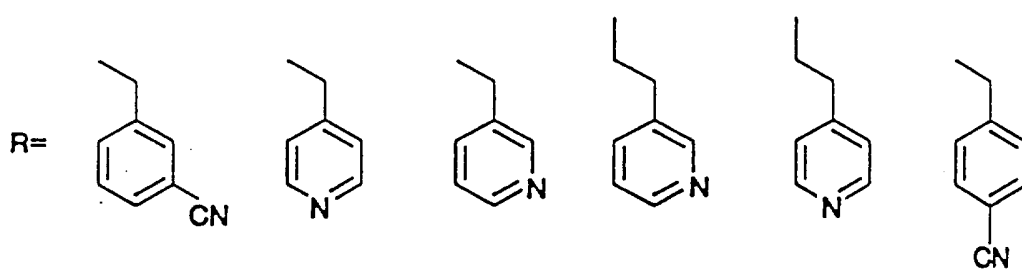
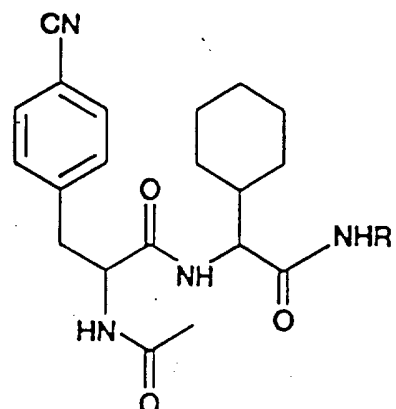
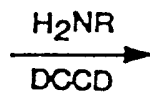
FIG. 2

3 / 4

1 SCHEMA

FIG. 3A



CC(=O)N[C@@H](Cc1ccc(C#N)cc1)C(=O)N[C@@H](C(=O)O)C2CCCCC2

1. MeI
2. NH_4OAc

