



PATENTSCHRIFT 150199

Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

Int. Cl.³

(11) 150 199 (44) 19.08.81 3(51) C 07 C 103/52
(21) WP C 07 C / 220 769 (22) 30.04.80

-
- (71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Berlin, DD
(72) Neubert, Klaus, Dr. Dipl.-Chem.; Mehlig, Burkhard, Dr. Dipl.-Chem.; Hartrodt, Bianka, Dr. Dipl.-Biochem.; Jakubke, Hans-Dieter, Prof. Dr. Dipl.-Chem.; Oehme, Peter, Prof. Dr.; Bergmann, Jutta, Dr., DD
(73) siehe (72)
(74) Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Institut für Wirkstoffforschung, 1136 Berlin, Alfred-Kowalke-Straße 4
-

54) Verfahren zur Herstellung von neuen Peptidwirkstoffen

57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von neuen Peptidwirkstoffen, die sowohl cyclische als auch lineare Strukturen im Molekül enthalten. Das Ziel der Erfindung besteht in der Herstellung von biologisch aktiven Wirkstoffen mit verbesserten Eigenschaften, insbesondere einer Wirkungsverstärkung, Erhöhung der Stabilität, Verbesserung der Transporteigenschaften sowie einer Beeinflussung der pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften. Die Aufgabe, solche Wirkstoffe zu entwickeln, wurde dadurch gelöst, daß Peptidwirkstoffe bzw. biologisch aktive Analoga, darunter verkürzte oder modifizierte Teilsequenzen, durch Säureamidbindungen entweder über freie α - oder ω -Amino- bzw. Carboxylgruppen oder über Brückenreagenzien - kovalent an cyclische Peptide gebunden werden. Die Erfindung ist von Bedeutung für die pharmazeutische Industrie, die klinische Pharmakologie und Diagnostik.

Verfahren zur Herstellung von neuen Peptidwirkstoffen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Peptidwirkstoffen, die sowohl cyclische als auch lineare Strukturen im Molekül enthalten. Durch die erfindungsgemäße Bindung von linearen Peptidwirkstoffen bzw. biologisch aktiven Wirkstoffanaloga, darunter verkürzten oder modifizierten Teilssequenzen (im folgenden auch als Wirkstoff bezeichnet), an cyclische Peptidstrukturen werden Wirkstoff-Cyclopeptid-Konjugate mit potentieller Wirkungsverstärkung, einschließlich einer prologierten bzw. differenzierten biologischen Aktivität, erhalten, die durch Substitution an bestimmten funktionellen Gruppierungen über ein weites Spektrum modifiziert werden können. Die Erfindung ist von Bedeutung für die pharmazeutische Industrie, die klinische Pharmakologie und Diagnostik.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist eine große Zahl von Verfahren zur Knüpfung von Peptidbindungen bekannt. Auch sind Verfahren beschrieben, die zur Cyclisierung linearer Peptide führen (vgl. E. Wünsch, Synthese von Peptiden - Houben - Weyl Bd. 15/I und II, Methoden der organischen Chemie, Ed. E. Müller, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1974).

Obwohl eine Verankerung von Wirkstoffen, darunter pharmakologischer und agrochemischer Art, an polymere Träger, vor allem

mit immunologischer Aufgabenstellung und zur Depotwirkung, seit längerem bekannt ist (G.E. Allan et al., Nature 234, 349 (1971); H.G. Batz et al., Angew. Chem. 84, 1189 (1972); K. Hofmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3516 (1976), ist eine kovalente Fixierung von Peptidwirkstoffen an cyclische Peptidstrukturen mit der Zielstellung einer Wirkungsverstärkung bisher in der Literatur nicht beschrieben worden.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht in der Herstellung von Peptidwirkstoffen bzw. biologisch aktiven Wirkstoffanaloga mit verbesserten Eigenschaften, insbesondere einer Wirkungsverstärkung, Erhöhung der Stabilität, Verbesserung der Transporteigenschaften sowie einer Beeinflussung der pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften.

Darlegung des Wesens der Erfindung

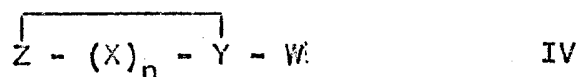
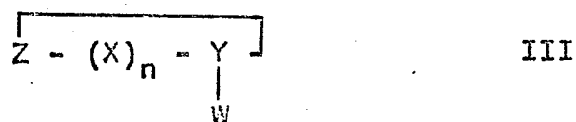
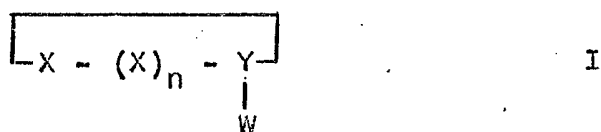
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Peptidwirkstoffe bzw. biologisch aktive Wirkstoffanaloga zu entwickeln, die folgende Vorteile aufweisen:

- a) Potentielle Wirkungsverstärkung des betreffenden Wirkstoffes, einschließlich prolongierter bzw. differenzierter biologischer Wirkungen infolge Änderung der Molekülparameter, besonders der Hydrophobie der Molekülstruktur
- b) Potentielle Verbesserung der Transporteigenschaften des betreffenden Wirkstoffes
- c) Beeinflussung der pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften des betreffenden Wirkstoffes durch entsprechende Substitution an geeigneten funktionellen Gruppen

der Peptidketten, die die Lipophilie der Molekülstruktur und andere physiko-chemische Parameter gezielt verändern

- d) Erhöhung der Stabilität des betreffenden Wirkstoffes gegenüber enzymatischem Abbau.

Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß Peptidwirkstoffe bzw. biologisch aktive Analoga, darunter verkürzte oder modifizierte Teilsequenzen, durch Säureamidbindungen - entweder über freie α - oder ω -Amino- bzw. Carboxylgruppen oder über Brückenreagenzien - kovalent an cyclische Peptide gebunden werden. Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens dargestellten Verbindungen sind durch die allgemeinen Formeln I bis IV



gekennzeichnet, worin

W - für die Aminosäuresequenz eines Wirkstoffes

X - für einen beliebigen Aminosäurerest

Y - für Asp, Glu (Verbindungstyp I bis III), Lys, Orn, Dab (Verbindungstyp I, III, IV)

(Abkürzungen für Aminosäuren und Peptidderivate vgl. IUPAC-

IUB Commission on Biochemical Nomenclature - J. Biol. Chem. 247, 977 (1972)

- Z - im Falle von Y = Glu, Asp, Lys, Orn, Dab für Lys, Orn und Dab (Verbindungstyp III) und
im Falle von Y = Orn, Lys, Dab für Glu und Asp (Verbindungstyp IV)

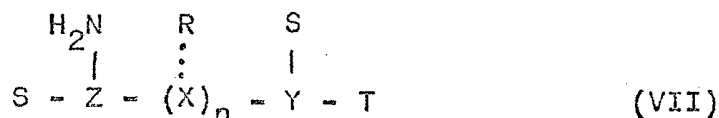
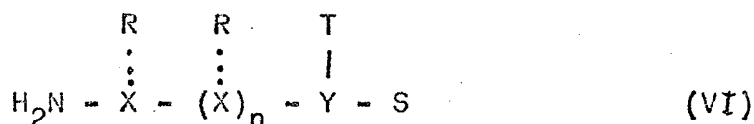
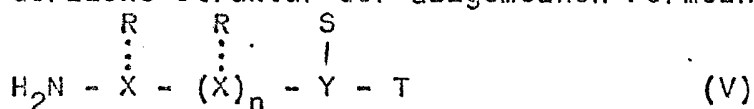
stehen und

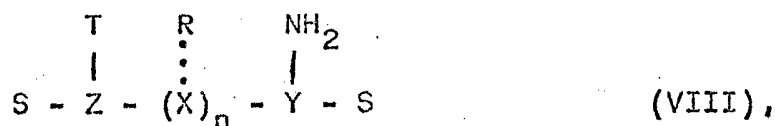
n - die Bedeutung 0, 1, 2, 3, 4, 8, 10 besitzt.

Die lineare Vorstufe der gewünschten cyclischen Peptidstruktur mit selektiv geschützter Seitenkettenfunktion (Verbindungstyp I und III) bzw. mit selektiv geschützter C-terminaler Carboxylgruppe an Y (Verbindungstyp II und IV) wird nach den bekannten Verfahren der Peptidchemie aufgebaut (vgl. E. Wünsch, s.o.), danach in eine für die beabsichtigte Cyclisierungsstrategie

- DCCI-Verfahren mit Zusatzkomponenten (A)
- Mischanhydrid-Methode (B)
- Azidverfahren (C)
- Aktivesteraminolyse (D)

erforderliche Struktur der allgemeinen Formeln V bis VIII

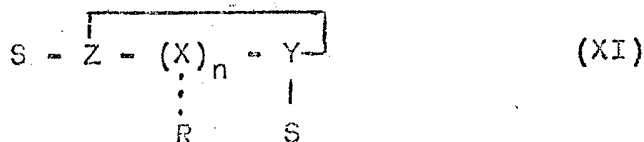
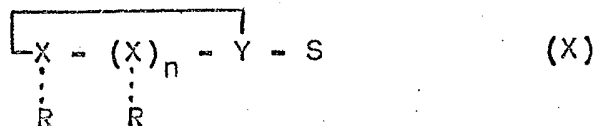


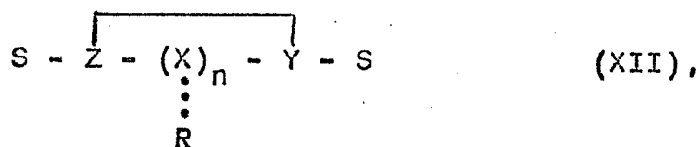


worin X, Y, Z und n wie zuvor definiert sind und R, S, T folgende Bedeutungen besitzen:

- R - in Abhängigkeit der Synthesestrategie eventuell erforderlicher Seitenkettenschutz bei trifunktionellen Aminosäuren
- S - entsprechend der Festlegung für Y und Z eine α - oder ω -Amino- bzw. α - oder ω -Carboxylschutzgruppe
- T - OH (Cyclisierungsvariante A bzw. B)
NH-NH₂ (Cyclisierungsvariante C), Überführung ins Azidaktivierter Ester (Cyclisierungsvariante D)

überführt und nach einer der genannten Strategien der Ringschlußreaktion unterworfen. Man erhält nach Reinigung an Ionenaustauschern und Sephadex-Gelfiltration als Zwischenprodukte die cyclischen Peptide der allgemeinen Formeln IX bis XII





worin X, Y, Z, R, S und n die oben genannte Bedeutung haben.

Nach selektiver Freisetzung der Seitenkettenfunktion an Y wird an das cyclische Peptid der vorgesehene lineare Peptidwirkstoff kovalent gebunden. Dabei können auch verkürzte oder modifizierte Teilsequenzen des linearen Peptidwirkstoffs eingesetzt werden. Man verwendet Sequenzen, die für die kovalente Bindung geeignete teilgeschützte Strukturen besitzen und knüpft die Bindung über eine freie N-terminale Amino- bzw. C-terminale Carboxylgruppe bzw. eine freie ω -Amino- oder Carboxylfunktion in der Seitenkette oder über sogenannte Brückenreagenzien, wie Dicarbonsäuren bzw. Alkyldiamine unterschiedlicher Kettenlänge, nach den üblichen Methoden der Peptidchemie.

Anschließend werden die verbliebenen Schutzgruppen unter den in der Peptidchemie üblichen Bedingungen durch Acidolyse, Hydrogenolyse, alkalische Hydrolyse oder Hydrazinolyse entsprechend der Zielstellung vollständig oder teilweise entfernt.

Nach Reinigung, vorzugsweise durch Säulenchromatographie an Kieselgel bzw. Sephadex wird das gewünschte Wirkstoff-Cyclopeptid-Konjugat der allgemeinen Formeln I bis IV erhalten.

Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen weisen eine erhöhte bzw. prolongierte oder differenzierte biologische Aktivität auf.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Es werden folgende Abkürzungen verwendet:

Aminosäuresymbole entsprechend IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, J. Biol. Chem. 247, 977 (1972)

AcOH	Essigsäure
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
DC	Dünnschichtchromatogramm, -chromatographisch
DCCI	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
EE	Essigsäureethylester
Fp	Schmelzpunkt
i. Vak.	im Vakuum
Min.	Minuten
OBu	tert. Butylester
OMe	Methylester
OPfp	Pentafluorphenylester
RT	Raumtemperatur
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Z	Benzyloxycarbonyl

Folgende Laufmittelsysteme (in Volumenanteilen) zur Dünnschichtchromatographie auf Silicagel-Fertigplatten (Silufol UV 254, CSSR) wurden verwendet:

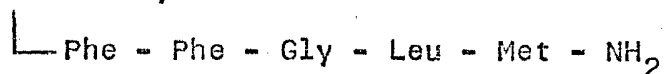
BAW	2-Butanol-Ameisensäure-Wasser	80 + 20 + 20
BEW	1-Butanol-Essigsäure-Wasser	75 + 13,5 + 11,5
CM	Chloroform-Methanol	90 + 10
EPEW	Essigester-Pyridin-Essigsäure-Wasser	10 + 10 + 10 + 10

Bei den Aminosäureanalysen stellt die mit *) gekennzeichnete Aminosäure den Bezugswert dar.

Beispiel I

Kovalente Bindung von Substanz P (7-11) - Pentapeptid an
cyclo (Glu-Pro)

cyclo (Glu - Pro)



I. 1. cyclo (Glu - Pro)
 $\begin{array}{c} | \\ \text{OH} \end{array}$

Von 4,5 g (10 mmol) Z-Glu(OBut)-Pro-OMe in Methanol wird mit Pd/Kohle (10%) die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe bei 30°C hydrogenolytisch entfernt. Danach wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat i. Vak. auf ca. 30 ml eingeeengt. Nach Zugabe einiger Tropfen 32%-iger Ammoniaklösung wird der Ansatz 24 h bei ca. 45°C stehen gelassen, anschließend i. Vak. eingeeengt, mit Ether verrührt, abfiltriert und der erhaltene Rückstand zur Entfernung der tert. Butylestergruppe mit 20 ml Trifluoressigsäure bei RT behandelt. Nach 45 Min. wird das Spaltreagenz i. Vak. abgezogen und der ölige Rückstand mit Ether digeriert, abgesaugt, mit Ether gewaschen und über P₂O₅/KOH getrocknet.

Ausbeute: 0,85 g (38 % d. Th., über 3 Stufen)

Fp: 173 - 175°C

$[\alpha]_D^{22}$: - 110,0° (c=1, AcOH)

DC: einheitlich in BEW, CM, EPEW

C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄ (226,33)	Ber.	C	53,09	H	6,24	N	12,38
	Gef.	C	52,89	H	6,58	N	12,70

I. 2. H - Phe - Phe - Gly - Leu - Met - NH₂ . HCl

Der Aufbau des Pentapeptids erfolgte ausgehend von 3,0 g (10 mMol) H-Leu-Met-NH₂.HCl (H.-D. Jakubke, Ch. Kleßen, K. Neubert; J. prakt. Chem. 319, 640 (1977) durch schrittweise Anknüpfung der entsprechenden tert.-Butyloxycarbonylamino-säure-pentafluorphenylester (13 mMol) in DMF (K. Neubert, B. Hartrodt, S. Koch, M. Bienert, E. Klauschenz, H.-D. Jakubke; Die Pharmazie, im Druck). Zur Deblockierung der N^α-Aminoschutzgruppen diente jeweils 1,1 n HCl/AcOH - 30 Min. bei RT.

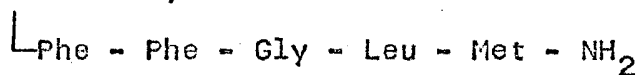
Ausbeute: 5,2 g (80 % d. Th.)

Fp: Zers. ab 140°C

[α]_D²²: - 77,6 ° (c=1, DMF)

DC: einheitlich in BEW, EPEW

I. 3. cyclo (Glu - Pro)



a) Kovalente Bindung nach der Mischanhydrid-Technik

0,4 g (1,77 mMol) cyclo (Glu - Pro) werden in 20 ml THF/DMF (4:1) gelöst und nach Abkühlen auf -15°C mit 0,22 ml (1,77 mMol) N-Ethylmorpholin versetzt. Unter Rühren gibt man 0,23 ml (1,77 mMol) Chlorameisensäureisobutylester zur Lösung. Nach 8 Min. fügt man 0,18 ml (1,42 mMol) N-Ethylmorpholin und sofort danach 0,92 g (1,42 mMol) H-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂.HCl in 10 ml THF hinzu. Man rührt 2 h bei -15°C und 12 h bei RT. Danach wird das Lösungsmittel i. Vak. abgezogen, der Rückstand mit Wasser ausgerührt, abgesaugt und auf der Fritte nacheinander mit 5%iger KHSO₄-Lösung, Wasser, gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen und i. Vak. über P₂O₅ getrocknet. Anschließend wird

das Rohprodukt jeweils 2 mal mit 25 ml Methanol und Ether extrahiert und aus Essigsäure/Ether umgefällt.

Ausbeute: 0,44 g (38 % d. Th.)

Fp: 172,5 - 173,5°C

$[\alpha]_D^{22}$: - 43,2° (c=1, AcOH)

DC: einheitlich in CM, EPEW

Aminosäuren-Analyse:	Glu	Pro	Phe	Gly	Leu*	Met
Ber.	1	1	2	1	1	1
Gef.	0,89	0,92	2,04	1,00	1,00	0,87

Biologische Testung: Kontraktion am isolierten Meerschweinchen-Ileum

Relative Aktivität: 27 % (Substanz P $\hat{=}$ 100 %)

Vergleichswert für Substanz P (7-11)-Pentapeptid: 1,4 %

b) Kovalente Bindung nach dem König-Geiger-Verfahren

Zu einer auf -5°C gekühlten Lösung von 0,3 g (1,33 mMol) cyclo(Glu-Pro), 0,84 g (1,3 mMol) H-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂.HCl, 0,17 ml (1,3 mMol) N-Ethylmorpholin und 0,2 g (1,46 mMol) N-Hydroxybenzotriazol in 8 ml DMF gibt man 0,3 g (1,46 mMol) DCCI in 2 ml DMF hinzu und läßt den Ansatz 0,5 h bei -5°C, 2 h bei 0°C und 12 h bei RT rühren. Nach Zugabe einiger Tropfen AcOH wird die Reaktionsmischung auf 0°C abgekühlt, der sich gebildete Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, i. Vak. eingeengt und das Rohprodukt durch Zugabe von 5%iger KHSO₄-Lösung ausgefällt. Der Feststoff wird wie unter a) beschrieben aufgearbeitet.

Ausbeute: 0,35 g (33 % d. Th.)

Fp: 172 - 174 °C

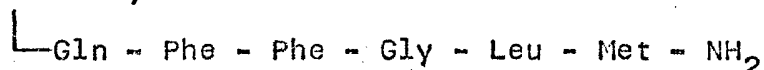
$[\alpha]_D^{22}$: - 43,0° (c=1, AcOH)

DC: einheitlich in CM, EPEW

Beispiel II

Kovalente Bindung von Substanz P (6-11)-Hexapeptid an cyclo (Glu-Pro)

cyclo (Glu-Pro)



0,23 g (1 mMol) cyclo(Glu-Pro) werden unter Rühren in 12 ml THF/DMF (3:1) gelöst und bei -15°C mit 0,13 ml (1 mMol) N-Ethylmorpholin und 0,13 ml (1 mMol) Chlorkohlensäureisobutylester versetzt. Nach 8 Min. gibt man 0,1 ml (0,8 mMol) N-Ethylmorpholin und sofort danach 0,62 g (0,8 mMol) H-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂·HCl (erhalten nach I.2. durch Umsetzung von H-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ mit Boc-Gln-OPfp und anschließende Deblockierung mit 1,1 n HCl/AcOH - 10 Min. bei 10°C , umkristallisiert aus Methanol/EE; Fp: $228 - 233^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$: $-43,0^{\circ}$ (c=0,5; DMF) in 10 ml DMF) hinzu. Der Ansatz wird 2 h bei -15°C und 12 h bei RT gerührt und wie unter I.3.a) beschrieben aufgearbeitet.

Ausbeute: 0,32 g (42 % d. Th.)

Fp: $209 - 210,5^{\circ}\text{C}$

$[\alpha]_{\text{D}}^{22}$: $-56,3^{\circ}$ (c=0,5; AcOH)

DC: einheitlich in CM, EPEW

Aminosäuren-Analyse:	Glu	Pro	Phe	Gly	Leu*	Met
Ber.	2	1	2	1	1	1
Gef.	2,00	0,91	2,07	1,00	1,00	0,85

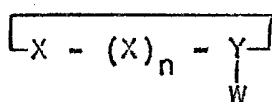
Biologische Testung: Kontraktion am isolierten Meerschweinchen-Ileum

Relative Aktivität: 227 % (Substanz P $\hat{=}$ 100 %)

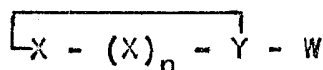
Vergleichswert für Substanz P (6-11)-Hexapeptid: 50 %

Erfindungsanspruch

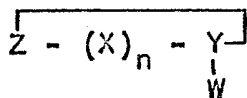
1. Verfahren zur Herstellung von neuen Peptidwirkstoffen, die sowohl cyclische als auch lineäre Strukturen im Molekül enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß Wirkstoff-Cyclopeptid-Konjugate der allgemeinen Formeln I bis IV



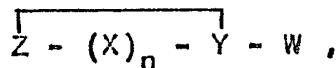
I



II



III



IV

worin

W - für die Aminosäurefrequenz eines Wirkstoffes

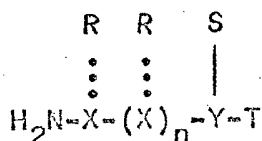
X - für einen beliebigen Aminosäurerest

Y - für Asp, Glu (Verbindungstyp I bis III), Lys, Orn, Dab (Verbindungstyp I, III, IV)

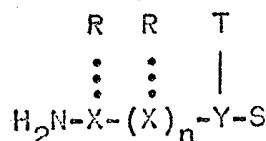
Z - im Falle von Y= Glu, Asp, Lys, Orn, Dab für Lys, Orn und Dab (Verbindungstyp III) und im Falle von Y= Orn, Lys, Dab für Glu und Asp (Verbindungstyp IV)

stehen und

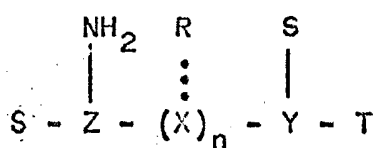
n - die Bedeutung 0, 1, 2, 3, 4, 8, 10 besitzt, aus cyclischen Peptiden der allgemeinen Formeln IX bis XII, die durch Ringschluß linearer Strukturen der allgemeinen Formeln V bis VIII entstehen



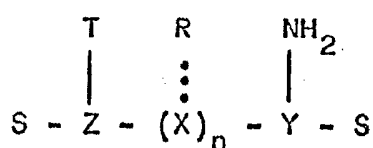
V



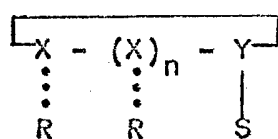
VI



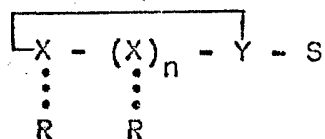
VII



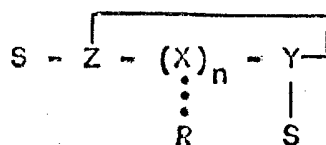
VIII



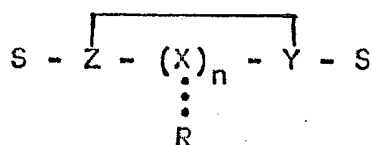
IX



X



XI



XII,

worin X, Y, Z und n wie zuvor definiert sind und

R - in Abhängigkeit der Synthesestrategie eventuell erforderlicher Seitenkettenschutz bei trifunktionellen Aminosäuren

S - entsprechend der Festlegung für Y und Z eine α - oder ω -Amino- bzw. α - oder ω -Carboxylschutzgruppe

T - OH, NH - NH₂, aktivierter Ester

bedeuten,

und linearen Peptidwirkstoffen bzw. biologisch aktiven Analoga, darunter verkürzten oder modifizierten Teilsequenzen, durch kovalente Verknüpfung gewonnen werden.

2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die cyclischen Peptide mit in Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz und unter Berücksichtigung essentieller Strukturelemente partialgeschützten Peptidwirkstoffen bzw. biologisch aktiven Analoga, darunter verkürzten oder modifizier-

ten Teilsequenzen, über eine freie N-terminale Amino- bzw. C-terminale Carboxylgruppe bzw. eine freie ω -Amino- oder Carboxylfunktion in der Seitenkette oder über Brückenreagenzien, wie Dicarbonsäuren oder Alkyldiamine, über Säureamidbindungen verknüpft, anschließend die verbliebenen Schutzgruppen vollständig oder partiell entfernt werden und nach Reinigung die Wirkstoff-Cyclopeptid-Konjugate erhalten werden.

3. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß die cyclischen Peptide der allgemeinen Formeln IX bis XII durch Ringschluß der linearen Strukturen V bis VIII gebildet werden, wobei als Cyclisierungsstrategie das DCCI-Verfahren mit Zusatzkomponenten oder die Mischanhydrid-Methode gewählt werden, wenn T für OH steht, das Azidverfahren gewählt wird, wenn T für $\text{NH} - \text{NH}_2$ steht und die Aktivesteraminolyse gewählt wird, wenn T für aktivierter Ester steht.