



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 289 545 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 07 K 7/10
C 07 K 1/10
A 61 K 37/02

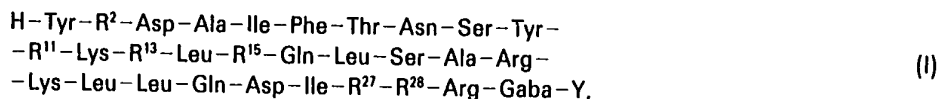
DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 07 K / 332 207 5	(22)	30.08.89	(44)	02.05.91
(31)	4498/88	(32)	31.08.88	(33)	HU
	3660/89		19.07.89		
(71)	siehe (73)				
(72)	Kovács, Magdolna, Dr.; Horváth, Judit, Dr.; Vigh, Sándor, Dr.; Mezö, Imre, Dr.; Teplán, István, Dr.; Szöke, Balázs, Dr.; Seprödi, János, Dr.; Vadász, Zsolt; Hegedüs, Edit; Makara, Gábor, Dr.; Rappay, György, Dr., HU				
(73)	MTA Kutatás-és Szervezetilemző Intézete, Budapest, HU				
(74)	Patentanwälte Viering u. Jentschura, Steinsdorfstraße 6, W - 8000 München 22, DE				
(54)	Verfahren zur Herstellung von neuen Peptiden				

(55) Peptide-Herstellung; Sekretionssteigerung Wachstumshormon; Arzneimittel

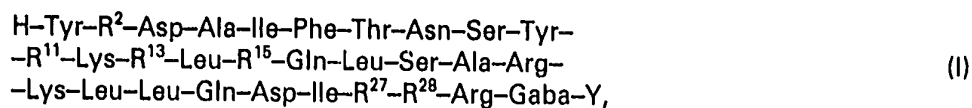
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Peptiden der allgemeinen Formel (I) und Salzen davon



worin R² Ala oder D-Ala bedeutet, R¹¹ Arg oder D-Arg ist, R¹³ Val oder Ile bedeutet, R¹⁵ Gly, Leu, Phe oder eine Valonzbindung ist, R²⁷ Met oder Nle bedeutet, R²⁸ Ser, D-Ser oder Asn ist, und Y OH oder NH₂ bedeutet. Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) werden nach bekannten Methoden der Peptidchemie hergestellt. Die erfindungsgemäß hergestellten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) steigern die Sekretion des Wachstumshormons und können zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten und in der Tiermedizin und Tierzucht verwendbaren Kompositionen eingesetzt werden.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von neuen Peptiden der allgemeinen Formel (I) und Salzen davon



worin

- R^2 Ala oder D-Ala bedeutet,
 R^{11} Arg oder D-Arg ist,
 R^{13} Val oder Ile bedeutet,
 R^{15} Gly, Leu, Phe oder eine Valenzbindung ist,
 R^{27} Met oder Nle bedeutet,
 R^{28} Ser, D-Ser oder Asn ist, und
 Y OH oder NH_2 bedeutet,

und gegebenenfalls von pharmazeutischen Präparaten mit GRF Wirkung oder gegebenenfalls von in der Tierzucht verwendbaren Kompositionen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die entsprechenderweise geschützten Aminosäuren oder Aminosäurefragmente nach in der Peptidchemie bekannten Methoden in geeigneter Reihenfolge kuppelt, die Schutzgruppen abspaltet und erwünschtenfalls das erhaltene Peptid in ein Salz überführt oder aus einem erhaltenen Salz das Peptid freisetzt oder in ein anderes Salz überführt und gegebenenfalls die Verbindungen der allgemeinen Formel I oder ein pharmazeutisch geeignetes Salz oder Metallkomplex davon mit üblichen inerten pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen vermischt und zu einer galenischen Form bringt oder gegebenenfalls die Verbindungen der allgemeinen Formel I oder ein in der Tierzucht verwendbares Salz oder Metallkomplex davon mit geeigneten, in der Tierzucht üblichen Hilfsstoffen vermischt und zu einer in der Tierzucht anwendbaren Form bringt.

2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und Salzen davon, in welchen R^{13} Val, R^{15} Gly oder Leu und R^{28} Ser bedeuten und R^2 , R^{11} , R^{27} und Y die im Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die entsprechenden Ausgangsstoffe verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und Salzen davon, in welchen R^2 Ala, R^{11} Arg, R^{13} Val, R^{15} Gly, R^{27} Met oder Nle und R^{28} Asn bedeuten und Y die im Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die entsprechenden Ausgangsstoffe verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und Salzen davon, in welchen R^2 Ala, R^{11} Arg, R^{13} Ile, R^{15} Gly, R^{27} Met oder Nle und R^{28} Asn bedeuten und Y die im Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die entsprechenden Ausgangsstoffe verwendet.
5. Verfahren nach Anspruch 1 zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel (I) und Salzen davon, in welchen R^2 Ala, R^{11} Arg, R^{13} Val, R^{15} Gly, R^{27} Nle und R^{28} Ser bedeuten und Y die im Anspruch 1 angegebene Bedeutung hat, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die entsprechenden Ausgangsstoffe verwendet.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Peptiden, die in der Humanmedizin und in der Tierheilkunde als Arzneimittel verwendet werden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Die erfindungsgemäß herstellbaren neuen Peptide sind dem, die Sekretion des Wachstumhormons fördernden Faktor analog. Die Sekretion des Wachstumhormons fördernden Hormone (Growth Hormone Releasing Factor; weiterhin „GRF“ genannt) und Analoge davon spielen sowohl in der Medizin und der Tierheilkunde als auch in der Tierzucht eine sehr wichtige Rolle. Diese

Verbindungen werden in der Humanmedizin zur Behandlung von, mit dem Mangel oder der herabgesetzten Sekretion des Wachstumshormons zusammenhängenden abnormalen Zuständen und in der Tierheilkunde und in der Tierzucht in erster Reihe zur Wachstumsförderung, Steigerung der Futterverwertung, Verbesserung des Fleisch/Fett-Verhältnisses und Erhöhung der Milchproduktion verwendet.

Kurz nach Isolierung des in der Natur vorkommenden, „natürlichen“ humanen GRFs (weiterhin „hGRF“ genannt) sind die auf die Klarstellung der Korrelation zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung gerichteten Versuche begonnen. Es wurde gefunden, daß die Aminosäuresequenz vom hGRF (ein 44gliedriges Peptid) der Aminosäuresequenz von, aus dem Organismus mehrerer Säugetiere (z. B. Schwein, Rind, Schaf) isoliertem GRF sehr ähnlich ist. Als aktives Zentrum der Moleküle erwies sich im allgemeinen der, die Aminosäuren in den Stellungen 3–21 enthaltende Teil. Die biologische Aktivität der kürzeren Peptidketten ist im allgemeinen der Wirksamkeit des natürlichen Hormons unterlegen. Die Versuche haben jedoch gezeigt, daß sogar das Peptid hGRF(1–29)-NH₂ (d. h. das natürliche Peptidamid humanen Ursprungs, welches die 1–29. Aminosäuren, vom N-Terminus berechnet, enthält) im Vergleich zum natürlichen hGRF(1–44)-NH₂ eine günstige Aktivität besitzt [Nature 300, 276 (1982); J. Med. Chem. 30, 219 (1987); Peptides, Seite 481 (Herausgeber: D. Theodoropoulos, Verlag: Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1988); Proceedings of the Ninth Am. Peptide Symposium (Verlag: Pierce Chem. Co., Rockford, Illinois, 1985) Seite 707; Biochem. Biophys. Res. Commun. 123, 854 (1984)]. Die mit Analogon von hGRF-(1–29)-NH₂ durchgeführten Versuche haben den Beweis gestellt, daß vom Gesichtspunkt der biologischen Aktivität betrachtet, der N-Terminus-Teil wichtiger als der C-Terminus-Teil ist und die Aktivität der Peptide im allgemeinen niedriger als die Wirksamkeit der Peptidamide ist [J. Med. Chem. 28, 181 (1985)]. Es wurde weiterhin festgestellt, daß die biologische Aktivität von Peptiden, welche aus weniger Gliedern als das natürliche Hormon bestehen, vorteilhaft beeinflusst werden kann, falls man einige Aminosäuren der Peptidkette durch andere Aminosäuren ersetzt. Dementsprechend wird z. B. durch den Austausch D-Ala² und Leu¹⁵ die Aktivität bzw. biologische Halbwertszeit der Analoge erhöht [J. Med. Chem. 28, 181 (1985)]. Nach weiteren Erfahrungen führt der Austausch der, dem N-Terminus naheliegenden bzw. in den Stellungen 1–11 befindlichen Aminosäuren gegen den D-Antipoden zu einer Erhöhung der biologischen Wirkung. Es geht in den obigen Publikationen und in den Versuchsergebnissen von D. Coy und Mitarbeitern [Peptides 7, Suppl. 1, 49–52 (1986)] weiterhin hervor, daß die 27. Aminosäure des in der Natur vorkommenden Hormons (d. h. das leicht oxydierbare Methionin) durch die strukturell am nächsten stehende Aminosäure (d. h. durch Norleucin) ersetzt werden kann, ohne die Aktivität aufzuheben.

Nach einer, für die praktische Anwendung relevanten allgemeinen Erfahrung sind jene GRF-Analoga wirksam, welche mindestens 29 Aminosäuren enthalten. Gemäß den US Patentschriften Nr. 4518586 und 4528190 können die obigen Vorgänge nicht nur bei humanen Hormonen, sondern auch bei mehreren Hormonen tierischen Ursprungs beobachtet werden.

Es ist aus den obigen Veröffentlichungen weiterhin bekannt, daß die 1–29. Aminosäuresequenz des in der Natur vorkommenden Hormons bei den aus Mensch und Schwein gewonnenen Hormonen identisch ist. Die 1–29. Aminosäuresequenz des aus Rind und Ziege isolierten Hormons unterscheidet sich von den obigen Hormonen darin, daß in der Stellung 28 anstatt Serin die Aminosäure Asparagin anwesend ist. Die Sequenz der 1–29. Aminosäuren im Schaf-GRF ist derselben des aus Rind oder Ziege gewonnenen Hormons ähnlich, diese Aminosäuresequenz enthält jedoch in der Stellung 13 anstatt Valin die Aminosäure Isoleucin. Nach der Fachliteratur [J. Dairy Sci. 70, 2511 (1986) und 71, 92 (1988)] kann durch Verabreichung von humanem GRF(1–44)-NH₂ und GRF(1–29)-NH₂, trotz der unterschiedlichen Struktur, die Milchproduktion von Rindern sowohl qualitativ als auch quantitativ günstig beeinflusst werden.

Ziel der Erfindung

Durch die Erfindung werden Verfahren zur Herstellung neuer Peptide, die dem die Sekretion des Wachstumshormons fördernden Faktor analog sind, und eine wesentlich größere Aktivität im Vergleich zu den in der Natur vorkommenden Hormonen aufweisen, zur Verfügung gestellt.

Darlegung des Wesens der Erfindung

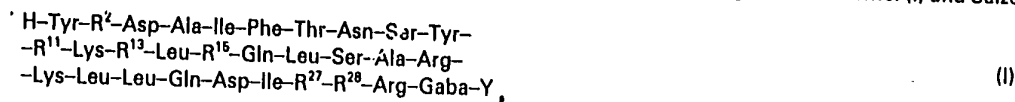
Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahren zur Herstellung von GRF-Analogen, welche mindestens so wirksam oder sogar wirksamer sind als das in der Natur vorkommende Hormon bzw. dessen, aus den Aminosäuren 1–29. bestehende Sequenz, bereitzustellen.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß die aus dreißig Aminosäuren bestehenden Analoga, welche an der 30-Stellung anstatt Glutamin die Aminosäure γ -Aminomilchsäureamid enthalten und deren 1–29. Aminosäuresequenz der in der Natur vorkommenden Sequenz entspricht oder teilweise bekannte und teilweise neue Aminosäuresubstitutionen enthält, die Wirksamkeit von in der Natur vorkommenden GRF bzw. GRF(1–29)-NH₂ oder GRF(1–29)-OH wesentlich übertreffen.

Die in der vorliegenden Beschreibung verwendeten, aus drei Buchstaben bestehenden Abkürzungen der Aminosäuren, entsprechen den Empfehlungen von IUPAC-IVB Biochemical Nomenclature [J. Biol. Chem. 247, 977 (1972)]. Falls wir nichts anderes mitteilen, besitzen die Aminosäuren eine L-Konfiguration. Die verwendeten weiteren Abkürzungen haben die folgenden Bedeutungen:

Gaba	Rest der γ -Aminomilchsäure
Boc	tert. Butoxycarbonylgruppe
BHA	Benzhydrylaminogruppe
TFA	Trifluoressigsäure
DIC	Diisopropylcarbodiimid
HOBt	1-Hydroxy-benzotriazol
HF	Fluorwasserstoff
MPLC	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie
HPLC	Flüssigkeitschromatographie mit großer Leistungsfähigkeit
TLC	Dünnschichtchromatographie

hGRF aus humaner Hypophyse isolierter natürlicher GRF (aus 44 Gliedern bestehendes Peptid)
 hpGRF-44 aus humanem Pankreastumor isolierter GRF, dessen Aminosäurezusammensetzung mit derjenigen von GRF Hypophyseursprungs übereinstimmt
 bGRF aus Rindhypophyse stammender natürlicher GRF (44gliedriges Peptid), dessen 1-29. Aminosäuresequenz mit derjenigen des aus Ziege isolierten Hormons übereinstimmt
 oGRF aus Schafhypophyse isolierter natürlicher GRF (44gliedriges Peptid)
 GH Wachstumshormon
 STH release Sekretion (Ausscheidung) des Wachstumshormons.
 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von neuen Peptiden der allgemeinen Formel (I) und Salzen davon



worin

R² Ala oder D-Ala bedeutet,
 R¹¹ Arg oder D-Arg ist,
 R¹³ Val oder Ile bedeutet,
 R¹⁵ Gly, Leu, Phe oder eine Valenzbindung ist,
 R²⁷ Met oder Nle bedeutet,
 R²⁸ Ser, D-Ser oder Asn ist, und
 Y OH oder NH₂ bedeutet,

nach dem man die entsprechenderweise geschützten Aminosäuren oder Aminosäurefragmente nach in der Peptidchemie bekannten Methoden in geeigneter Reihenfolge kuppelt, die Schutzgruppen abspaltet und erwünschtenfalls das erhaltene Peptid in ein Salz überführt oder aus einem erhaltenen Salz das Peptid freisetzt oder in ein anderes Salz überführt. Nach einer vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Verbindungen der allgemeinen Formel (I) hergestellt, in welchen R¹³ Val, R¹⁵ Gly, Leu und R²⁸ Ser bedeuten und R², R¹¹, R²⁷ und Y die obige Bedeutung haben. Diese Verbindungen sind mit den aus Mensch und Schwein isolierten Hormonen analog. Nach einer anderen vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Verbindungen der allgemeinen Formel (I) hergestellt, in welchen R² Ala, R¹¹ Arg, R¹³ Val, R¹⁵ Gly, R²⁷ Met oder Nle und R²⁸ Asn bedeuten und Y die obige Bedeutung hat. Diese Verbindungen sind mit den aus Rind und Ziege gewonnenen Hormonen analog. Nach einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Verbindungen der allgemeinen Formel (I) hergestellt, in welchen R² Ala, R¹¹ Arg, R¹³ Ile, R¹⁵ Gly, R²⁷ Met oder Nle und R²⁸ Asn bedeuten und Y die obige Bedeutung hat. Diese Verbindungen sind mit dem aus Schaf isolierten Hormon analog. Nach einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden Verbindungen der allgemeinen Formel (I) hergestellt, in welchen R² Ala, R¹¹ Arg, R¹³ Val, R¹⁵ Gly, R²⁷ Nle und R²⁸ Ser bedeuten und Y die obige Bedeutung hat. Die obigen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) besitzen besonders vorteilhafte Eigenschaften. Die neuen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können erfindungsgemäß nach den in der Peptidchemie bekannten Verfahren hergestellt werden. Diese Verbindungen können in Flüssigkeitsphase durch in der geeigneten Reihenfolge durchgeführte Kondensation der entsprechenderweise geschützten Aminosäuren oder - vorteilhafter - der aus den entsprechenderweise geschützten Aminosäuren gebildeten Fragmenten hergestellt werden. Die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können jedoch nach einer besonders vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens mit einer in fester Phase durchgeführten Synthese hergestellt werden. In diesem Falle wird zuerst die entsprechenderweise geschützte Gaba dem Harz angeknüpft, wonach die entsprechenderweise geschützten Aminosäuren oder daraus gebildeten Fragmenten in geeigneter Reihenfolge dazu gekuppelt werden. Die erfindungsgemäß hergestellten neuen Verbindungen können in der Humanmedizin, Tierheilkunde und Tierzucht zur Förderung der Sekretion des Wachstumshormons verwendet werden. Zu diesem Zweck werden die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) oder Salze davon in Form von pharmazeutischen Präparaten oder in der Tierheilkunde oder Tierzucht verwendbaren Kompositionen fertiggestellt. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten mit GRF-Wirkung (mit der, die Sekretion des Wachstumshormons fördernden Wirkung), nach dem man eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), worin R², R¹¹, R¹³, R¹⁵, R²⁷, R²⁸ und Y die oben angegebene Bedeutung haben, oder ein pharmazeutisch geeignetes Salz oder Metallkomplex davon mit üblichen inerten pharmazeutischen Trägern und/oder Hilfsstoffen vermischt und zu einer galenischen Form bringt. Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von in der Tierzucht verwendbaren Kompositionen, nach dem man eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), worin R², R¹¹, R¹³, R¹⁵, R²⁷, R²⁸ und Y die oben angegebene Bedeutung haben, oder ein in der Tierzucht verwendbares Salz oder Metallkomplex davon mit geeigneten, in der Tierzucht üblichen Hilfsstoffen vermischt und zu einer in der Tierzucht anwendbaren Form bringt. Die erfindungsgemäß hergestellten pharmazeutischen Präparate bzw. in der Tiermedizin, oder Tierzucht verwendbaren Kompositionen können die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) auch in Form von Salzen oder Metallkomplexen enthalten. Als Salze kommen Säureadditionssalze (z. B. Hydrochloride, Hydrobromide, Sulfate, Phosphate, Maleate, Acetate oder Citrate usw.) in Betracht. Die Komplexe der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) können z. B. mit Zink oder Eisen gebildete Komplexe sein. Die pharmazeutischen Präparate und in der Tierzucht verwendbaren Kompositionen können z. B. intravenös, intramuskular, subkutan, intranasal oder oral verabreicht werden. Die oral verabreichbaren Präparate können z. B. in Form von Tabletten fertiggestellt werden. Diese Präparate können neben dem Wirkstoff Hilfsstoffe, z. B. Träger (wie Calciumcarbonat), Bindemittel (wie Tragacanth, Maisstärke oder Gelatine), Sprengstoffe (wie Alginsäure) und Gleitmittel (wie Magnesiumstearat) enthalten. Flüssige Präparate können auch den Geschmack

verbessernde Mittel enthalten. Die in der Tierzucht verwendbaren, oral verabreichbaren Kompositionen können z. B. Futterpremixe sein.

Die in Form einer Injektion verabreichbaren Präparate können neben dem Wirkstoff zu Injektionszwecken geeignete flüssige Träger (z. B. eine isotonische Kochsalzlösung oder Phosphatpufferlösung) enthalten.

Der Wirkstoff kann auch in Form von Präparaten mit verzögerter Wirkung fertiggestellt werden. Zur Herstellung dieser Präparate wird der Wirkstoff in bekannte, die verzögerte Wirkung gewährleistende Polymere eingebettet.

Die tägliche Dosis der erfindungsgemäßen Wirkstoffe hängt von mehreren Faktoren (z. B. Spezies der zu behandelnden Individuen, Verabreichungsart, die zu erreichende Wirkung usw.) ab. Die tägliche Dosis liegt im allgemeinen zwischen 1 und 100 µg/kg Körpergewicht. Dieses Intervall ist jedoch bloß informativen Charakters und die tatsächlich verwendete Wirkstoffdosis kann sowohl niedriger als auch höher sein.

Die biologische Wirksamkeit der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) wird mit Hilfe von in-vitro und in-vivo-Testmethoden nachgewiesen.

In-vitro-Versuche

Die Ausscheidung (Sekretion) von GH wird in Funktion der Konzentration der Testverbindung gemessen. Die so erhaltenen Ergebnisse werden mit den, bei der Verabreichung von in der Natur vorkommenden hpGRF bzw. hGRF(1-29)-NH₂ verglichen. Die Menge von ausgeschiedenem GRF wird gemäß Radioimmunanalyse bestimmt (Zuverlässigkeitsgrenze 95%).

Unter in-vitro-Bedingungen zeigen die erfindungsgemäß hergestellten neuen Verbindungen der allgemeinen Formel (I) gemäß der an Zellkultur durchgeführten Bestimmung eine ungefähr fünfzigmal und nach den Superfusionsversuchen eine etwa zweimal höhere Aktivität als das bekannte, in der Natur vorkommende hpGRF-44.

Die Ergebnisse der an Zellkulturen durchgeführten Versuche werden in der Abbildung 1 veranschaulicht. Die Versuche werden mit einer s. g. Einschichtzellkultur (monolayer) von Rattenhypophyse vorgenommen. Im Diagramm werden die Ergebnisse von 18 Versuchen zusammengefaßt. Die Aktivität vom hpGRF-44 wird mit der Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindung Nle²⁷,Gaba³⁰-hGRF(1-30)-NH₂ (in der Abbildung mit der Kodenummer SZB-4-179 bezeichnet) verglichen. Die GH-Sekretion wird als Funktion der Konzentration der verabreichten Peptide illustriert. Der „Grundwert“ entspricht der natürlichen GH-Sekretion der Zellen. Es ist der Abbildung ersichtlich, daß zur Erzielung derselben Sekretion des Wachstumshormons (ng/Kultur) das bekannte hpGRF-44 in einer etwa fünfzigmal höheren Konzentration, als die erfindungsgemäß hergestellte Verbindung, verabreicht werden muß.

In-vivo-Versuche

Geschlechtsreife Wistar R Amsterdam Ratten (Körpergewicht 250-300 g) werden mit einer 60 mg/kg i. p. Dosis von Pentobarbital narkotisiert. Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe werden in einer 0,9 Gew.-%igen wäßrigen Natriumchloridlösung gelöst und 20 Minuten nach der Narkose intravenös (i. v.), intramuskular (i. m.) oder subkutan (s. c.) injiziert. Der jugularen Vene der Tiere werden vor (-1. Minute) und nach (5., 15. und 30. Minute) der Verabreichung des Wirkstoffes Blutproben genommen. Die Menge des ausgeschiedenen Wachstumshormons (GH) wird nach der Radioimmunanalyse bestimmt (Zuverlässigkeitsgrenze 95%). Als Testverbindung wird das Nle²⁷,Gaba³⁰-hGRF(1-30)-NH₂ eingesetzt. Als Referenzverbindung dient das hGRF(1-29)-NH₂. Die Testverbindung und der Standard (Referenzverbindung) werden in einer Dosis von 2 µg/kg Körpergewicht i. v. verabreicht. Unter Einwirkung der Verabreichung beider Verbindungen wurde eine Zunahme der Sekretion beobachtet. Die erfindungsgemäß hergestellte Verbindung übt jedoch eine wesentlich stärkere Wirkung als die bekannte Referenzverbindung aus. Der GH-Spiegel der mit der erfindungsgemäß hergestellten Verbindung behandelten Ratten beträgt nach 5 Minuten 164%, nach 10 Minuten 155% und nach 30 Minuten 204% (100% = GH-Blutspiegel der mit der Referenzverbindung behandelten Tiere). Bei den Versuchen werden auch die folgenden Testverbindungen verwendet:

Verbindung 1: D-Ala²,Nle²⁷,Gaba³⁰-hGRF(1-30)-NH₂

Verbindung 2: D-Ala²,Leu¹⁵,Nle²⁷,Gaba³⁰-hGRF(1-30)-NH₂

Verbindung 3: D-Ala²,D-Arg¹¹,Leu¹⁵,Nle²⁷,Gaba³⁰-hGRF(1-30)-NH₂

Als Referenzverbindung (Standard) wird das hGRF(1-29)-NH₂ eingesetzt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind den Tabellen I-III zu entnehmen. In den Tabellen wird die prozentuale Aktivitätserhöhung ebenfalls angegeben.

Das intravenös verabreichte hGRF(1-29)-NH₂ steigert die Sekretion des Wachstumshormons. Die prozentuale Aktivitätserhöhung der intravenös verabreichten Verbindungen der allgemeinen Formel (I) wird mit den unter Anwendung von hGRF(1-29)-NH₂ erhaltenen Werten verglichen.

Bei intramuskularer und subkutaner Verabreichung erwies sich das hGRF(1-29)-NH₂ in den verwendeten Dosen praktisch unwirksam. Deshalb wurde in diesen Testversuchen die Aktivität der Verbindungen der allgemeinen Formel (I) durch die prozentuale Erhöhung der Menge des im Blut ursprünglich anwesenden Wachstumshormons (GH Grundwert) gekennzeichnet.

Tabelle I
Plasma-GH-Spiegel (ng/ml $\pm$ SE) nach intravenöser Verabreichung

Zeit Minuten	In einer Dosis von 0,8 μ g/kg verabreichtes Peptid					In einer Dosis von 2 μ g/kg verabreichtes Peptid				
	Standard	Verbin- dung 1	Erhöhung %	Verbin- dung 2	Erhöhung %	Standard	Verbin- dung 1	Erhöhung %	Verbin- dung 2	Erhö- hung %
-1	80,46 $\pm$ 8,96 n = 13	71,64 $\pm$ 18,42 n = 11		96,90 $\pm$ 18,43 n = 9		125,22 $\pm$ 13,12 n = 9	124,29 $\pm$ 14,28 n = 7		100,12 $\pm$ 11,38 n = 10	
+5	311,00 $\pm$ 34,32 n = 15	535,54 $\pm$ 103,86 n = 11	172*	468,92 $\pm$ 68,86 n = 9	151*	1061,11 $\pm$ 165,60 n = 9	1801,43 $\pm$ 213,84 n = 7	170*	1427,90 $\pm$ 170,45 n = 10	135*
+15	93,60 $\pm$ 7,54 n = 15	240,73 $\pm$ 63,65 n = 11	257*	203,51 $\pm$ 38,10 n = 9	217*	393,13 $\pm$ 64,62 n = 9	1177,00 $\pm$ 137,81 n = 7	299*	614,38 $\pm$ 99,30 n = 10	156*
+30	48,73 $\pm$ 3,37 n = 15	74,27 $\pm$ 9,20 n = 11	140	71,49 $\pm$ 7,62 n = 9	140	109,22 $\pm$ 10,39 n = 9	293,00 $\pm$ 28,63 n = 7	268*	133,20 $\pm$ 14,56 n = 7	120

*p < 0,01

n: Zahl der behandelten Tiere

Tabelle II
Plasma-GH-Spiegel (ng/ml $\pm$ SE) nach intramuskulärer Verabreichung

Zeit Minuten	Verbindung 1				Verbindung 2				Verbindung 3			
	„A“	%	„B“	%	„A“	%	„B“	%	„A“	%	„B“	%
-1	49,60 $\pm$ 6,07 n = 9		48,80 $\pm$ 5,38 n = 8		62,85 $\pm$ 14,67 n = 9		51,73 $\pm$ 6,07 n = 8		51,80 $\pm$ 1,46 n = 5		43,50 $\pm$ 12,43 n = 4	
+5	119,40 $\pm$ 24,83 n = 5	238	242,20 $\pm$ 51,34 n = 5	493	122,09 $\pm$ 20,22 n = 9	193	658,86 $\pm$ 56,50 n = 8	1290	108,50 $\pm$ 16,42 n = 6	209	247,00 $\pm$ 27,76 n = 4	568
+15	120,00 $\pm$ 14,38 n = 5	238	351,00 $\pm$ 58,17 n = 5	716	138,04 $\pm$ 26,44 n = 9	219	409,17 $\pm$ 89,49 n = 8	786	98,67 $\pm$ 18,53 n = 5	189	213,75 $\pm$ 45,77 n = 4	489
+30	56,00 $\pm$ 17,30 n = 5	110	149,40 $\pm$ 63,03 n = 5	304	70,19 $\pm$ 9,13 n = 9	110	184,02 $\pm$ 32,93 n = 8	353	54,50 $\pm$ 2,63 n = 5	105	110,66 $\pm$ 28,56 n = 4	254

„A“: in einer Dosis von 2 μ g/kg verabreicht„B“: in einer Dosis von 5 μ g/kg verabreicht

%: prozentuale Erhöhung im Vergleich zum Grundwert (in der -1. Minute gemessener GH-Spiegel)

n: Zahl der Versuchstiere

Tabelle III
Plasma-GH-Spiegel (ng/ml $\pm$ SE) nach subkutaner Verabreichung

Zeit Minuten	Verbindung 1				Verbindung 2				Verbindung 3			
	„A“	%	„B“	%	„A“	%	„B“	%	„A“	%	„B“	%
-1	68,17 $\pm$ 9,61 n = 6		89,67 $\pm$ 17,63 n = 9		68,57 $\pm$ 8,33 n = 7		63,30 $\pm$ 7,20 n = 11		63,33 $\pm$ 16,70 n = 3		237,50 $\pm$ 33,40 n = 6	
+5	285,00 $\pm$ 68,15 n = 5	419	410,67 $\pm$ 55,22 n = 9	455	304,00 $\pm$ 45,49 n = 7	443	555,85 $\pm$ 106,57 n = 11	880	555,85 $\pm$ 106,57 n = 11	880	237,50 $\pm$ 33,40 n = 6	374
+15	376,67 $\pm$ 78,63 n = 6	552	429,22 $\pm$ 69,48 n = 9	476	203,29 $\pm$ 48,89 n = 7	294	438,92 $\pm$ 98,15 n = 11	695	193,17 $\pm$ 42,35 n = 6	305	193,17 $\pm$ 42,35 n = 6	305
+30	145,67 $\pm$ 34,45 n = 6	213	137,78 $\pm$ 30,36 n = 9	152	69,14 $\pm$ 9,16 n = 7	100	140,38 $\pm$ 29,85 n = 11	222	83,83 $\pm$ 16,87 n = 6	132	83,83 $\pm$ 16,87 n = 6	132

„A“: in einer Dosis von 5 μ g/kg verabreicht„B“: in einer Dosis von 12,5 μ g/kg verabreicht

%: prozentuale Erhöhung im Vergleich zum Grundwert (in der -1. Minute gemessener GH-Wert)

n: Zahl der Versuchstiere

Die Vorteile der erfindungsgemäßen herstellbaren neuen Verbindungen können wie folgt zusammengefaßt werden:

- wesentlich größere Aktivität im Vergleich zu den in der Natur vorkommenden Hormonen;
- Gaba kommt im lebenden Organismus (z. B. im Nervensystem) vor, ist nicht organismusfremd, sein Metabolismus ist aufgeklärt;
- in Folge der räumlichen Ausfüllung ist Gaba ein, bei den in fester Phase durchgeführten Peptidsynthesen ausgezeichneter „Spacer“ und als erste Aminosäure zum Polymer, welches das Peptid trägt, angeknüpft, gewährleistet infolgedessen einen guten Synthesewirkungsgrad;
- der Austausch von Methionin in der 27-Stellung gegen Nle ist für die Synthese chemisch vorteilhaft.

Ausführungsbeispiele

Weitere Einzelheiten des erfindungsgemäßen Verfahrens sind den nachstehenden Beispielen zu entnehmen, ohne den Schutzzumfang auf diese Beispiele einzuschränken.

Beispiel 1

Herstellung von Nle²⁷,Gaba³⁰-hGRF(1-30)-NH₂

Das Peptid wird unter Anwendung eines Beckman 990 B Peptidsynthetisators an einem Benzhydrylaminharz (Kapazität: 0,65 Milliäquivalente/g) hergestellt. Die geschützte Boc-Gaba-OH Aminosäure wird in einem Überschuß von 3 Äquivalenten, auf die Kapazität des Harzes berechnet, eingesetzt, wobei das DIC Kondensationsmittel und der HOBt Katalysator in einer, mit der geschützten Aminosäure äquivalenten Menge verwendet werden. Die Reaktionszeit der Anknüpfung der geschützten Boc-Gaba-OH beträgt 12 Stunden. Danach wird die Harz-geschützte Aminosäure-Verbindung zur Kontrolle der Vollständigkeit der Anknüpfung zum Harz mit einer Ninhydrinreaktion geprüft. Die Anknüpfung der geschützten Boc-Gaba-OH Aminosäure zum Harz ist im allgemeinen bereits nach der ersten Kupplung vollständig. Sollte jedoch die Ninhydrinreaktion positiv sein (dies weist darauf hin, daß die Aminogruppen des Benzhydrylaminharzes nicht vollständig substituiert sind), kann die Anknüpfung zum Harz mit Hilfe der symmetrischen Anhydridmethode vollständig gemacht werden. (Auf Grund der Gewichtszunahme entspricht die Kapazität des Harzes 75–80% des von der Herstellerfirma angegebenen Wertes.)

Das Boc-Gaba-BHA Harz wird auf übliche Weise gespalten und neutral gemacht. Danach wird die Peptidsynthese stufenweise nach dem folgenden Schema durchgeführt:

1. Waschen mit CH ₂ Cl ₂	dreimal 2 Minuten
2. Spaltung mit 33% TFA/CH ₂ Cl ₂	einmal 2 Minuten
3. Spaltung mit 33% TFA/CH ₂ Cl ₂	einmal 25 Minuten
4. Waschen mit CH ₂ Cl ₂	dreimal 2 Minuten
5. Waschen mit Äthanol	dreimal 2 Minuten
6. Waschen mit Chloroform	dreimal 2 Minuten
7. Neutralisierung mit 10% Et ₃ N/CHCl ₃	zweimal 3 Minuten
8. Waschen mit CHCl ₃	zweimal 2 Minuten
9. Waschen mit CH ₂ Cl ₂	dreimal 2 Minuten
10. Zugabe der Boc-Aminosäure	—
11. Kupplung mit DIC	einmal 120–300 Minuten
12. Waschen mit CH ₂ Cl ₂	zweimal 2 Minuten
13. Waschen mit Äthanol	

Bei der Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird als Scavenger ein Gemisch von 0,5% Indol und 0,2% Thioanisol oder 1% Anisol und 0,5% Diäthylsulfid verwendet.

Bei der Synthese werden, auf 1 Millimol Boc-Gaba-BHA Harz berechnet, in einer der Sequenz entsprechenden Reihenfolge 3 Millimole Boc-Aminosäure, 3 Millimole DIC Kupplungsmittel und 3 Millimole HOBt Katalysator in einer mit Dichlormethan gebildeten Lösung eingesetzt. Bei der Kupplung von Boc-Arg(Tos)OH wird ein 1:1 Gemisch (Volumenteile) von Dimethylformamid und Dichlormethan verwendet. Die Kupplung sämtlicher geschützten Aminosäuren wird nach der Carboxidimidmethode durchgeführt. Bei der Kupplung von Boc-Gln bzw. Boc-Asn wird jedoch der p-Nitrophenylester der entsprechenden geschützten Aminosäure in einem dreifachen Überschuß, in Gegenwart einer äquivalenten Menge des HOBt Katalysators verwendet. In diesem Falle wird die Reaktion in einem 1:1 Gemisch (Volumenteile) von Dimethylformamid und Dichlormethan 12–14 Stunden lang vorgenommen. Die Seitenketten der geschützten Aminosäuren werden im Falle von Tyr, Ser und Thr mit der Benzylgruppe, bei Lys mit der 2-Chlor-benzoyloxycarbonylgruppe (2Cl-Z), im Falle von Arg mit der Tosylgruppe (Tos) geschützt, und die Carboxylgruppen von Glu und Asp werden mit der Cyclohexylgruppe (Chx) geschützt. Die Schutzgruppen der Seitenketten und das Peptid werden vom Harz mit Hilfe von flüssigem HF so entfernt, daß die Peptid-Harz-Verbindung – im Falle von 0,25 Millimolen Peptid-BHA-Harz – in Anwesenheit von 2,5 ml, 10 Gew.-% p-Kresol enthaltendem Anisol und 100 mg Dithiothreitol etwa in 20–25 ml HF bei 0°C eine Stunde lang stehengelassen wird. Der HF wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird mit absolutem Diäthyläther behandelt, wonach das Peptid vom festen Rückstand mit 15 Gew.-%iger Essigsäure abgelöst wird. Das Peptid wird in 15 Gew.-%iger Essigsäure an einer Sephadex G-50-Säule durch Gelfiltrieren gereinigt. Danach wird das Peptid nach der MPLC Methode an einer C₁₈ reverse Phase Silikagelsäule (Syncroprep RP-4 3u) nach einer Gradienteluierung mit Hilfe von aus 0,25 M Triäthylaminphosphat (TEAP, pH: 2,557) und 40 Vol.-% TEAP – 60 Vol.-% Acetonitril hergestellten Lösungen gereinigt. Die Fraktionen werden nach TLC und HPLC Analyse identifiziert. Die Fraktionen, welche das gewünschte Produkt enthalten, werden vereinigt und das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird zuerst salzfrei gemacht und danach zwecks weiterer Reinigung wieder auf eine MPLC-Säule gebracht und einer Gradienteluierung mit einer, aus 10 Gew.-%iger Essigsäurelösung und mit einer 30 Vol.-% Isopropanol enthaltender 10 Gew.-%iger Essigsäurelösung unterworfen. Die Reinheit und das Produktgehalt der Fraktionen

werden auf die obenangegebene Weise bestimmt. Das Peptid wird schließlich durch Gefriertrocknen in Form einer festen Substanz abgetrennt.

Die charakteristischen physikalischen Konstanten des Produktes sind wie folgt:

TLC: $R_f = 0,40$ [Adsorbent: DC Alufolien Kieselgel 60 (Katalog Nr. 5553), Laufmittel: 4:1:2 (Volumenteile) Gemisch von n-Butanol:Essigsäure:Wasser]

HPLC: Als Adsorbent wird eine Vydac 218 TP546 Säule und als Eluiermittel ein Gemisch von 30 Vol.-% Acetonitril und 70 Vol.-% einer 0,25 M wäßrigen Triäthylammoniumphosphatlösung (pH 2,257) verwendet. Die Bestimmung wird auf Grund der UV-Absorption bei 215 nm und einer Empfindlichkeit von 0,1 AuFS durchgeführt. Die ISCO (Model 2350) HPLC Pumpen werden mit einem IBM-XT Computer nach einem ISCO ChemResearch Programm gesteuert. Es wird eine isochratische Eluierung durchgeführt. Das Produkt wird durch das Verhältnis von Retentionszeit zu Durchbruchzeit (k') gekennzeichnet; $k' = 4,37$.

Beispiel 2

Herstellung von $\text{Nle}^{27}, \text{Gaba}^{30}\text{-hGRF(1-30)-OH}$

Das Peptid wird nach Beispiel 1, jedoch an einem Merrifield Harz (Chlormethylharz) hergestellt. Das Harz (Kapazität: 0,5–0,9 Milliäquivalente/g) wird mit einem dreifachigem Überschuß von Boc-Gaba-Cesiumsalz, in Dimethylformamid, bei 50°C 20 Stunden lang umgesetzt. Als Ergebnis der Reaktion wird ein 0,4–0,6 Millimole Gaba/g substituiertes Harz erhalten. Die Peptidsynthese wird auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise durchgeführt. Das erhaltene Peptid wird, wie im Beispiel 1 angegeben, gereinigt. Nach TLC und HPLC Analyse ist das erhaltene Produkt einheitlich.

Beispiel 3

Herstellung von $\text{D-Ala}^2, \text{Nle}^{27}, \text{Gaba}^{30}\text{-hGRF(1-30)-NH}_2$

Man verfährt wie im Beispiel 1, mit dem Unterschied, daß man als 2. Glied des Peptids anstatt Boc-Ala die geschützte Aminosäure Boc-D-Ala verwendet. Die physikalischen Konstanten des Produktes werden, wie im Beispiel 1 beschrieben, bestimmt. Nach TLC und HPLC Analyse ist das Produkt einheitlich.

TLC: $R_f = 0,39$

HPLC: $k' = 4,55$.

Beispiel 4

Herstellung von $\text{D-Ala}^2, \text{Leu}^{15}, \text{Nle}^{27}, \text{Gaba}^{30}\text{-hGRF(1-30)-NH}_2$

Man verfährt wie im Beispiel 3, mit dem Unterschied, daß man als 15. Glied des Peptids anstatt Boc-Gly die geschützte Aminosäure Boc-Leu verwendet. Die physikalischen Konstanten des Produktes werden, wie im Beispiel 1 beschrieben, bestimmt. Nach TLC und HPLC Analyse ist das Produkt einheitlich.

TLC: $R_f = 0,41$

HPLC: $k' = 4,55$.

Beispiel 5

Herstellung von $\text{D-Ala}^2, \text{D-Arg}^{11}, \text{Leu}^{15}, \text{Nle}^{27}, \text{Gaba}^{30}\text{-hGRF(1-30)-NH}_2$

Man verfährt wie im Beispiel 3, mit dem Unterschied, daß man an der 11-Stellung der Peptidkette anstatt Boc-Arg(Tos) die geschützte Aminosäure Boc-D-Arg(Tos) und an der 15-Stellung anstatt Boc-Gly die geschützte Aminosäure Boc-Leu kuppelt. Die physikalischen Konstanten des Produktes werden auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise bestimmt. Nach TLC und HPLC Analyse hat sich das Produkt als einheitlich erwiesen.

TLC: $R_f = 0,38$

HPLC: $k' = 3,52$.

Beispiel 6

Herstellung von $\text{D-Ala}^2, \text{Phe}^{15}, \text{Nle}^{27}, \text{Gaba}^{30}\text{-hGRF(1-30)-NH}_2$

Man verfährt wie im Beispiel 3, mit dem Unterschied, daß man an der 15-Stellung der Peptidkette anstatt Boc-Gly die geschützte Aminosäure Boc-Phe kuppelt. Die physikalischen Konstanten des Produktes werden, wie im Beispiel 1 beschrieben, bestimmt. Nach TLC und HPLC Analyse ist das Produkt einheitlich.

TLC: $R_f = 0,42$

HPLC: $k' = 4,75$.

Beispiel 7

Herstellung von $\text{D-Ala}^2, \text{desGly}^{15}, \text{Nle}^{27}, \text{Gaba}^{30}\text{-hGRF(1-30)-OH}$

Man verfährt wie im Beispiel 2, mit dem Unterschied, daß man an der 2-Stellung der Peptidkette anstatt Boc-Ala die geschützte Aminosäure Boc-D-Ala kuppelt, und in der 15-Stellung der Peptidkette die Kupplung mit Boc-Gly weggelassen wird. Die physikalischen Konstanten des Produktes werden auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise bestimmt. Nach TLC und HPLC Analyse ist das Produkt einheitlich.

HPLC: $k' = 4,40$.

Beispiel 8

Herstellung von $\text{D-Ala}^2, \text{Leu}^{15}, \text{Nle}^{27}, \text{Gaba}^{30}\text{-hGRF(1-30)-OH}$

Man verfährt wie im Beispiel 7, mit dem Unterschied, daß in der 15-Stellung der Peptidkette Boc-Leu gekuppelt wird. Die physikalischen Konstanten des Produktes werden auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise bestimmt. Nach TLC und HPLC Analyse ist das Produkt einheitlich.

HPLC: $k' = 4,60$.

Beispiel 9

Herstellung von Gaba³⁰-bGRF(1-30)-NH₂

Man verfährt wie im Beispiel 1, mit dem Unterschied, daß an der 27-Stellung der Peptidkette anstatt Boc-Nle die geschützte Aminosäure Boc-Met und an der 28-Stellung anstatt Boc-Ser(bzl) der aktive Boc-Asparaginsäureester gekuppelt wird. Nach TLC und HPLC Analyse ist das Produkt einheitlich.

Beispiel 10

Herstellung von Nle²⁷,Gaba³⁰-bGRF(1-30)-NH₂

Man verfährt wie im Beispiel 9, mit dem Unterschied, daß an der 27-Stellung der Peptidkette Boc-Nle gekuppelt wird. Nach TLC und HPLC Analyse ist das Produkt einheitlich.

Beispiel 11

Herstellung von Gaba³⁰-oGRF(1-30)-NH₂

Man verfährt wie im Beispiel 9, mit dem Unterschied, daß man in der 13-Stellung der Peptidkette anstatt Boc-Val die geschützte Aminosäure Boc-Ile kuppelt. Nach TLC und HPLC Analyse ist das Produkt einheitlich.

Beispiel 12

Herstellung von Nle²⁷,Gaba³⁰-oGRF(1-30)-NH₂

Man verfährt wie im Beispiel 11, mit dem Unterschied, daß man an der 27-Stellung der Peptidkette anstatt Boc-Met Boc-Nle kuppelt. nach TLC und HPLC Analyse ist das Produkt einheitlich.

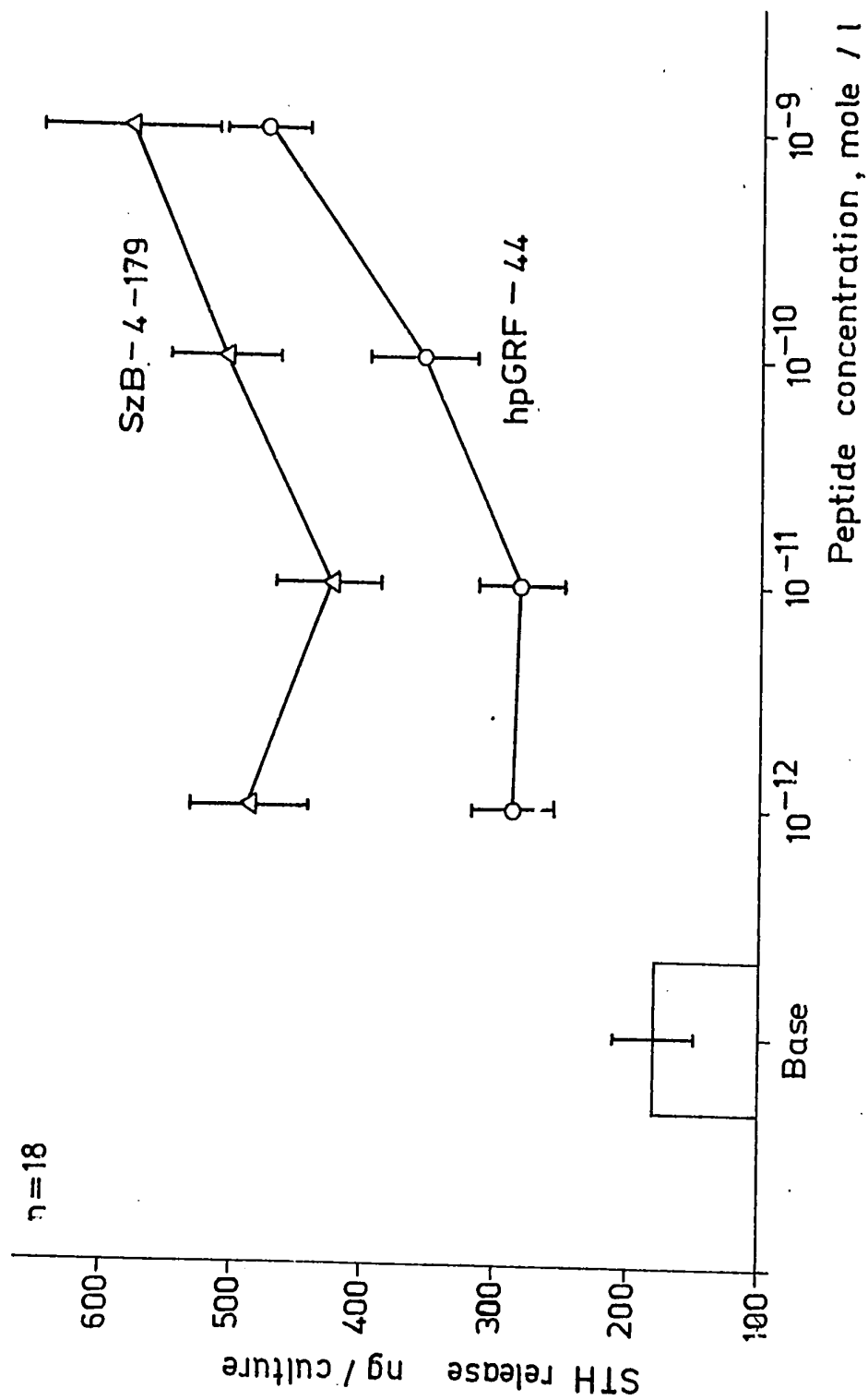


Fig.1