(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 31 762 T2** 2005.03.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 832 900 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 31 762.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/RU96/00116**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 915 261.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/40740**
(86) PCT-Anmeldetag: **06.05.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **19.12.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **01.04.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **03.03.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.03.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 5/06**
C07K 5/08, C07K 5/10, A61K 38/05, A61K 38/06, A61K 38/07

(30) Unionspriorität:
95108559 07.06.1995 RU

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Immunotech Developments Inc., Mississauga, Ontario, CA

(72) Erfinder:
Deigin, Vladislav Isakovich, Moscow, RU;
Korotkov, Andrei Marxovich, Moscow, RU

(74) Vertreter:
Benedum, U., Dipl.-Chem.Univ.Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 81669 München

(54) Bezeichnung: **PEPTIDE UND GEWINNUNGSVERFAHREN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Medizin und insbesondere Verfahren zur Herstellung biologisch aktiver Substanzen, die immunregulierende Eigenschaften besitzen und die eingesetzt werden können in der Medizin, in der Veterinärmedizin und in der experimentellen Biochemie.

Stand der Technik

[0002] Die vielen Studien auf diesem Gebiet zeigen, dass die Entwicklung neuer harmloser immunregulierender Peptide sehr wichtig ist. Diese Peptide sollen vor dem Hintergrund der Immunschwächeerkrankung die immer größere Zahl von Erkrankungen wie malignes Neoplama, Sepsis, chronische und latente Infektion bekämpfen.

[0003] Das bekannteste Verfahren zur Isolierung neuer Peptide besteht in der Isolierung einer wirksamen Peptidfraktionen aus Gewebeextrakten, Fraktionen und Aufreinigungen einschließlich der Isolierung von einzelnen Substanzen und deren Identifikation (SU N1737798, Erfinderzertifikat, erteilt am 20. März 1995). In der praktischen Medizin sind Thymusextrakte weithin bekannt als Regulatoren von Immunvorgängen, z.B. die Tymosin-Fraktion Nr. 5 (Goldstein, A.L., Guna A., Latz M.M., Hardy H.A., White A.), Thymalin (CH, N 6595 86). Die Extrakte enthalten Substanzen des Typs Polypeptid. Deren Herstellung aus den natürlichen Rohmaterialien ist aber wegen der Komplexität des Verfahrens und der kleinen Ausbeute an Wirksubstanzen begrenzt. Zudem besteht eine erhebliche Variabilität in deren physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften. Daneben sind in den natürlich Thymuspräparationen Trägerkomponenten vorhanden, welche Nebenwirkungen verursachen können. Der letzte Umstand gab dann den Anstoß für die Entwicklung synthetischer Peptide. Bislang wurden verschiedene immunregulierende Peptide synthetisiert: PCT/WO 089/06134, EP-A-230052, EP-A-406931, US 5021551, US 5013723. Diese synthetischen Peptide besitzen jeweils eine begrenzte Kombination notwendiger Eigenschaften; sie sind hochaktiv, gering toxisch, verursachen kaum Nebenwirkungen und können daher in der Medizin eingesetzt werden.

[0004] Das Ziel der beanspruchten Erfindung war die Synthese eines neuen biologisch wirksamen Peptids, das immunregulierende Wirkung besitzt und das folgende Formel 1 besitzt:

X-A-D-Trp-Y (I)

worin X ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff, Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, N-Valin, Prolin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, D-Alanin, D-Leucin, D-Isoleucin, D-Valin, D-N-Valin, D-Prolin, D-Tyrosin, D-Phenylalanin, D-Tryptophan, γ-Aminobutansäure und ξ-Aminocapronsäure; A ist ausgewählt aus der Gruppe D-Glutaminsäure und iD-Glutaminsäure; Y ist ausgewählt aus der Gruppe Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, N-Valin, Prolin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, D-Alanin, D-Leucin, D-Isoleucin, D-Valanin, D-N-Valin, D-Prolin, D-Tyrosin, D-Phenylalanin, D-Tryptophan, γ-Aminobutansäure und ξ-Aminocapronsäure, Hydroxyl- und C_1 bis C_3 substituierte Amide.

[0005] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Entwicklung eines völlig neuen Verfahrens für die Peptidsynthese, das nur eine kleinstmögliche Zahl einfacher Schritten erfordert und hohe Ausbeuten des Produkts der vorgenannten Struktur liefert. Dies ist in der pharmazeutischen Produktion sehr wichtig.

[0006] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Peptids der Formel I

X-A-D-Trp-Y (I)

wobei X, A und Y wie oben definiert sind, umfassend das Synthetisieren des Peptids in Lösung durch Öffnen des inneren Anhydrids von tert.-Butyloxycarbonylglutamin(D oder L)-Säure mit Hilfe des Kaliumsalzes von D-Trp-Y, weiteren Kettenaufbau mit Hilfe von aktivierten Ethern und gemischten Anhydriden bei vorläufiger Abtrennung der tert.-Butyloxycarbonylgruppe durch Behandeln mit Ameisensäure und anschließend chromatographische Auftrennung der α- und γ-Isomere.

[0007] Das Prinzip des neuen Verfahrens besteht in der Synthese von Glutamyl-haltigen Peptiden in Lösung durch Öffnung des inneren Anhydrids von tert.-Butyloxycarbonylglutamin(D oder L)-Säure mit Hilfe des jeweiligen D-Trp-Y-Derivats und gefolgt von der chromatographischen Auftrennung der α- und γ-Isomere. Die weitere Synthese erfolgt durch Aufbau der Peptidkette mit Hilfe von aktivierten Ethern der tert-Butyloxycarbonylaminosäuren.

[0008] Tabelle 1 zeigt die Rf_1-Werte (in Chloroform-Methanol/32%ige Essigsäure = 60:40:20) und Rf_2-Werte (in Butanol/Pyridin/Wasser/Essigsäure = 5:5:4:1) für eine Anzahl neuer Peptidanaloge.

Tabelle 1

Peptid	R_{f1}	R_{f2}
Abu-D-Glu-D-Trp-OH	0,32	0,53
Abu-iD-Glu-D-Trp-OH	0,29	0,49
Aca-D-Glu-D-Trp-OH	0,31	0,52
Aca-iD-Glu-D-Trp-OH	0,28	0,49
Ala-D-Glu-D-Trp-OH	0,34	0,61
Ala-iD-Glu-D-Trp-OH	0,32	0,55
D-Ala-D-Glu-D-Trp-D-Ala	0,22	0,41
D-Ala-D-Glu-D-Trp-OH	0,26	0,51
D-Ala-iD-Glu-D-Trp-D-Ala	0,25	0,50
D-Ala-iD-Glu-D-Trp-OH	0,25	0,51

D-Ile-D-Glu-D-Trp-D-Leu	0,35	0,53
D-Ile-D-Glu-D-Trp-OH	0,36	0,54
D-Ile-iD-Glu-D-Trp-D-Leu	0,34	0,53
D-Ile-iD-Glu-D-Trp-OH	0,27	0,52
D-Leu-D-Glu-D-Trp-OH	0,36	0,53
D-Leu-iD-Glu-D-Trp-OH	0,35	0,52
D-NVal-D-Glu-D-Trp-OH	0,33	0,51
D-NVal-iD-Glu-D-Trp-OH	0,32	0,51
D-Phe-D-Glu-D-Trp-Ala	0,37	0,56
D-Phe-iD-Glu-D-Trp-Ala	0,36	0,55
D-Pro-D-Glu-D-Trp-OH	0,38	0,58
D-Pro-iD-Glu-D-Trp-OH	0,37	0,58
D-Trp-D-Glu-D-Trp-OH	0,41	0,59
D-Trp-iD-Glu-D-Trp-OH	0,40	0,59
D-Tyr-D-Glu-D-Trp-D-Tyr	0,39	0,58
D-Tyr-iD-Glu-D-Trp-D-Tyr	0,38	0,58
D-Val-D-Glu-D-Trp-OH	0,34	0,51
D-Val-iD-Glu-D-Trp-OH	0,33	0,50
Gly-D-Glu-D-Trp-NVal	0,29	0,51
Gly-D-Glu-D-Trp-OH	0,30	0,54
Gly-iD-Glu-D-Trp-NVal	0,32	0,53
Gly-iD-Glu-D-Trp-OH	0,29	0,53
H-D-Glu-D-Trp-Abu	0,33	0,52
H-D-Glu-D-Trp-Aca	0,30	0,53
H-D-Glu-D-Trp-D-Ile	0,35	0,58
H-D-Glu-D-Trp-D-Pro	0,37	0,61
H-D-Glu-D-Trp-Gly	0,29	0,54
H-D-Glu-D-Trp-Ile	0,36	0,58
H-D-Glu-D-Trp-Leu	0,36	0,59
H-D-Glu-D-Trp-Lys	0,28	0,47
H-D-Glu-D-Trp-OH	0,36	0,56
H-D-Glu-D-Trp-Phe	0,39	0,61
H-D-Glu-D-Trp-Pro	0,38	0,59
H-D-Glu-D-Trp-Tyr	0,37	0,58
H-D-Glu-D-Trp-Val	0,38	0,61
H-iD-Glu-D-Trp-Abu	0,34	0,51
H-iD-Glu-D-Trp-Aca	0,33	0,50
H-iD-Glu-D-Trp-D-Ile	0,34	0,55
H-iD-Glu-D-Trp-D-Pro	0,36	0,58
H-iD-Glu-D-Trp-Gly	0,28	0,52
H-iD-Glu-D-Trp-Ile	0,34	0,57
H-iD-Glu-D-Trp-Leu	0,35	0,58
H-iD-Glu-D-Trp-Lys	0,27	0,45
H-iD-Glu-D-Trp-OH	0,30	0,52
H-iD-Glu-D-Trp-Phe	0,38	0,61
H-iD-Glu-D-Trp-Pro	0,37	0,60

H-iD-Glu-D-Trp-Tyr	0,35	0,58
H-iD-Glu-D-Trp-Val	0,36	0,60
Ile-D-Glu-D-Trp-D-Phe	0,42	0,68
Ile-D-Glu-D-Trp-OH	0,38	0,56
Ile-iD-Glu-D-Trp-D-Phe	0,40	0,67
Ile-iD-Glu-D-Trp-OH	0,37	0,55
Leu-D-Glu-D-Trp-OH	0,35	0,62
Leu-iD-Glu-D-Trp-OH	0,27	0,57
NVal-D-Glu-D-Trp-OH	0,35	0,61
NVal-iD-Glu-D-Trp-OH	0,34	0,60
Phe-D-Glu-D-Trp-OH	0,41	0,63
Phe-iD-Glu-D-Trp-OH	0,40	0,62
Pro-D-Glu-D-Trp-OH	0,43	0,63
Pro-iD-Glu-D-Trp-OH	0,42	0,62
Trp-D-Glu-D-Trp-OH	0,45	0,68
Trp-iD-Glu-D-Trp-OH	0,44	0,67
Tyr-D-Glu-D-Trp-OH	0,42	0,64
Tyr-iD-Glu-D-Trp-OH	0,41	0,63
Val-D-Glu-D-Trp-D-Val	0,46	0,68
Val-D-Glu-D-Trp-OH	0,33	0,50
Val-iD-Glu-D-Trp-D-Val	0,44	0,66
Val-iD-Glu-D-Trp-OH	0,34	0,52

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung

[0009] Das nachstehende Beispiel dient der Darstellung der Erfindung.

[0010] Beispiel: N-D-Glu-D-Trp-OH und H-iD-Glu-D-Trp-OH

1. Herstellung von Boc-D-Glu-OH

[0011] 14,7 g (0,1 M) H-D-Glu-OH wurde in 200 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH wurde mit 1 M KOH auf 10,2 eingestellt und eine Lösung von 33,0 g (0,3 M) BOC_2) in Dioxan unter intensivem Rühren zugefügt. Der pH wurde mit Hilfe eines pH-Stats überwacht. Nach Ende der Reaktion wurde das Gemisch in einen Scheidetrichter überführt. Es folgte eine Extraktion aus alkalischen Medium mit 3 × 150 ml Ethylacetat. Dann wurde 0,2%ige Schwefelsäurelösung langsam dem Wasser zugefügt und der pH auf 3,0 eingestellt. Das Boc-D-Glu-OH wurde in die organische Phase (3 × 200 ml) extrahiert. Die organische Phase wurde 3 mal mit 200 ml Na_2SO_4-gesättigter Lösung auf neutralen pH gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und dann zu einem Öl unter Vakuum eingedampft. Die Ausbeute betrug 16,7 g (68%).

2. Herstellung eines Gemisches von Boc-D-Glu-Trp-OH und Boc-iD-Glu-D-Trp-OH

[0012] Es wurde 16,7 g (0,068 M) Boc-D-Glu-OH in 200 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0°C abgekühlt und dann zu dieser Lösung 20,6 g (0,1 M) N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 100 ml Dimethylformamid unter Rühren zugefügt. Das Gemisch wurde bei 4°C 4 Stunden gerührt und dann 8 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Das ausgefallene Dicyclohexylcarbamid wurde dann durch Filtration abgetrennt und mit 2 × 50 ml Dimethylformamid gewaschen. Das Filtrat wurde durch Eindampfen unter Vakuum auf die Hälfte des Volumens konzentriert und dann hierzu 24,3 g (0,1 M) H-D-Trp-OH unter Kühlung auf 4°C und heftigen Mischen zugefügt. Die Lösung konnte sich dann auf Raumtemperatur erwärmen. Die Beendigung der Umsetzung wurde durch TLC in einem System aus Chloroform/Ethylacetat/Methanol = 6:3:1 überwacht und zwar durch das Verschwinden des Flecks für das innere Anhydrid der Boc-D-Glu-Säure. Der Rest des Dihexylcarbamids wurde durch Filtration abgetrennt, und das Dimethylformamid unter Vakuum verdampft. Es wurden 200 ml Ethylacetat und 200 ml 0,2%ige Schwefelsäurelösung zum ölähnlichen Rest zugesetzt. Die organische Schicht wurde abgetrennt, mit Na_2SO_4 gesättigter Lösung auf neutralen pH gebracht, und über Na_2SO_4 getrocknet. Die Ehtylacetatlösung wurde unter Vakuum eingedampft. Das resultierende ölähnliche Präzipitat bestand dann aus einem Gemisch von Boc-D-Glu-D-Trp-OH und Boc-iD-Glu-D-Trp-OH. Gesamtausbeute: 25,4 g (70%).

3. Herstellung von H-D-Glu-D-Trp-OH und H-iD-Glu-D-Trp-OH

[0013] 25,4 g Gemisch (0,048 M) wurde in 200 ml Ameisensäure gelöst und eine Stunde bei 40°C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum verdampft. Man erhielt ein dickes Öl. Die Peptide wurden abgetrennt und durch Ionenaustauschchromatographie auf einer Sephadex®-Säule mit einem Gradienten von 0,01 bis 0,2 Pyridin/Acetatpuffer aufgereinigt. Ausbeute: 5,7 g (35%) H-D-Glu-D-Trp-OH und 5,7 g (35%) H-iD-Glu-D-Trp-OH.

[0014] Die Peptide besaßen die nachstehenden physikalischen und chemischen Kennwerte:
Primärstruktur – H-D-Glu-D-Trp-OH und H-iD-Glu-D-Trp-OH.
Empirische Formel: – $C_{16}H_{20}N_3O_5$
Molekulargewicht – 334,35
Erscheinungsbild – gelb-weißes oder gräuliches Pulver
Löslichkeit – sofort löslich in Wasser, moderat löslich in Alkohol, unlöslich in Chloroform.
Das UV-Spektrum im Bereich von 250 bis 300 nm enthielt ein Maximum bei 280 ± 2 nm und eine Schulter bei 287 ± 2 nm.

[0015] Die biologische Aktivität des neuen Peptids wurde in Balb/c-Mäusen untersucht. Milzzellen der Mäuse wurden in RPMI 1640-Medium mit 2 ml Glutamin und 5% inaktiviertem fötalem Serum suspendiert, dann auf eine Platte mit flachen Boden verteilt. 100 µ1 (200000 Zellen) pro Vertiefung. Die zu untersuchende Präparation wurde dann zu Beginn der Kultivierung zugesetzt. Als ein Mitogen wurde Concanavallin A mit einer Endkonzentration von 2 µg pro Vertiefung eingesetzt. Die Platten wurden 48 Stunden bei 37°C mit 5% CO_2 inkubiert. Die Vermehrung der Zellen wurde durch den Einbau von 3H-Thymidin überwacht. Dieses wurde in einer Dosis von 5µg/ml 24 Stunden vor Ende der Kultur zugesetzt. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Szintillationszählers. Die Werte sind in Ereignissen pro Minute (CPM) angegeben. Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 2

Präparation	Ereignisse pro Minute*			
	Präparationsdosis (µm/ml)			
	1	5	10	20
iD-Glu-D-Trp	68594	63428	20043	13222
Cyclosporin A	67649	2698	574	569
Kontrolle	61467			

* Mittelwert von drei Bestimmungen

[0016] Die neuen Peptide inhibierten die Proliferation der Milzzellen.

[0017] Die Sicherheit der Peptide und ihre akute Toxizität wurden untersucht gemäß den Methodical Recommendations of the Pharmacological Commitee of the RF "Requirements to Preclinincal Studies of General Toxic Effect of New Pharmacological Substances" M., 1985.

[0018] Die Ergebnisse waren, dass eine 1000-fache intraperitoneale Dosis des Peptids keine akute toxischen Effekte besaß und das man mit diesen Dosen unmöglich eine LD_{50} erreichen konnte.

Kommerzielle Anwendung

[0019] Die biologisch aktiven Peptide können weithin in der Medizin und in der Veterinärmedizin eingesetzt werden.

Patentansprüche

1. Peptid der Formel I

X-A-D-Trp-Y (I)

wobei X ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff, Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, N-Valin, Prolin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, D-Alanin, D-Leucin, D-Isoleucin, D-Valin, D-N-Valin, D-Prolin, D-Tyrosin, D-Phenylalanin, D-Tryptophan, γ-Aminobutansäure und □-Aminocapronsäure; A ausgewählt aus der Gruppe D-Glutaminsäure und iD-Glutaminsäure, und Y ausgewählt aus der Gruppe Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, N-Valin, Prolin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, D-Alanin, D-Leucin, D-Isoleucin, D-Valin, D-N-Valin, D-Prolin, D-Tyrosin, D-Phenylalanin, D-Tryptophan, γ-Aminobutansäure, ξ-Aminocapronsäure, Hydroxyl und C_1- bis C_3-substituierte Amide.

2. Peptid mit der Sequenz H-iD-Glu-D-Trp-OH.

3. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend mindestens ein Peptid der Formel 1, wie in Anspruch 1 oder 2 beansprucht, und einen pharmazeutisch akzeptabler Träger.

4. Verwendung des Peptids nach Anspruch 1 oder 2 zur Inhibierung der Milzzellen-Vermehrung.

5. Verwendung des Peptids nach Anspruch 1 oder 2 wegen seiner immunoregulatorischen Wirkung.

6. Verfahren zur Herstellung eines Peptids der Formel I

X-A-D-Trp-Y (I),

wobei X ausgewählt ist aus der Gruppe Wasserstoff, Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, N-Valin, Prolin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, D-Alanin, D-Leucin, D-Isoleucin, D-Valin, D-N-Valin, D-Prolin, D-Tyrosin, D-Phenylalanin, D-Tryptophan, γ-Aminobutansäure und ξ-Aminocapronsäure; A ausgewählt aus der Gruppe D-Glutaminsäure, iD-Glutaminsäure; und Y ausgewählt aus der Gruppe Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, N-Valin, Prolin, Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, D-Alanin, D-Leucin, D-Isoleucin, D-Isoleucin, D-Valin, N-Valin, D-Prolin, D-Tyrosin, D-Phenylalanin, D-Tryptophan, γ-Aminobutansäure, ξ-Aminocapronsäure, Hydroxyl und C_1- bis C_3-substituierte Amide, umfassend das Synthetisieren des Peptids in Lösung durch Öffnen des inneren Anhydrids der tert-Butyloxycarbonylglutamin-(D oder L)-Säure mit dem K-Salz von D-Trp-Y, weitere Kettenverlängerung mithilfe von aktivierten Estern und gemischten Anhydriden unter vorläufiger Abtrennung der tert-Butyloxycarbonylgruppe durch eine Behandlung mit Ameisensäure und die anschließende chromatographische Auftrennung der α- und γ-Isomere.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen