



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.³: C 07 C 103/52
A 61 K 37/02

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ PATENTSCHRIFT A5

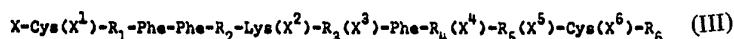
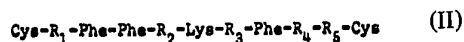
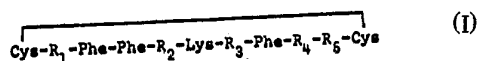
⑪

639 361

⑳ Gesuchsnummer:	3300/78	㉚ Inhaber: The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla/CA (US)
㉑ Anmeldungsdatum:	28.03.1978	
㉓ Priorität(en):	28.03.1977 US 781580	㉛ Erfinder: Wylie Walker Vale, jun., La Jolla/CA (US) Jean Edouard Frederic Rivier, La Jolla/CA (US) Marvin Ross Brown, La Jolla/CA (US)
㉔ Patent erteilt:	15.11.1983	
㉞ Patentschrift veröffentlicht:	15.11.1983	㉟ Vertreter: E. Blum & Co., Zürich

⑤④ Peptide, Verfahren zu deren Herstellung und pharmazeutische Präparate, welche diese als Wirkstoff enthalten.

⑤⑦ Die neuen Peptide entsprechen den Formeln I, II oder III



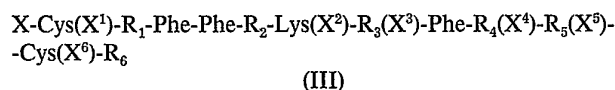
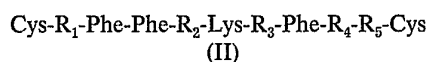
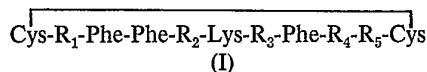
worin

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, X, X¹, X², X³, X⁴, X⁵ und X⁶ die im Patentanspruch 1 angegebene Bedeutung haben.

Die Peptide besitzen eine biologische Aktivität bezüglich der Hemmung des Wachstums-hormons sowie der Sekretion von Insulin und Glucagon. Sie werden als Wirkstoff in entsprechenden pharmazeutischen Präparaten eingesetzt. Einige der Peptide haben eine selektive Aktivität in einer der oben angegebenen Richtungen. Diejenigen mit weniger Aminosäuren in der Peptidkette als Somatostatin sind besonders einfach herstellbar.

PATENTANSPRÜCHE

1. Peptid, dadurch gekennzeichnet, dass es der Formel I, II oder III



entspricht oder ein Salz dieser Peptide ist, worin

Cys entweder D-Cys oder L-Cys bedeutet,

Phe für L-Phe steht,

Lys für L-Lys steht,

R₁ L-AspNH₂ oder eine direkte Bindung bedeutet,

R₂ L-Try oder D-Try darstellt,

R₃ für L-Phe oder L-Thr steht,

R₄ L-Thr oder eine direkte Bindung bedeutet,

R₅ L-Ser, L-Phe oder eine direkte Bindung darstellt,

unter der Voraussetzung, dass mindestens einer der Reste R₁, R₄ und R₅ eine direkte Bindung bedeutet,

X für ein Wasserstoffatom oder eine α-Aminoschutzgruppe steht, welche eine Acylgruppe, eine substituierte Alkylgruppe oder eine Trialkylsilylgruppe ist,

X¹ und X⁶ für Wasserstoffatome oder für Schutzgruppen der SH-Gruppierung von D-Cys oder L-Cys stehen, die die Bedeutung von Benzyl, p-Methoxybenzyl, Acetamidomethyl oder Trityl aufweisen,

X² ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe für die in der Seitenkette von L-Lys befindliche Aminogruppe darstellt, welche eine Benzyl-, Chlorbenzyloxycarbonyl-, Benzyl-oxycarbonyl-, Tosyl-, t-Amyloxycarbonyl- oder t-Butyloxycarbonyl-schutzgruppe ist,

X³, X⁴ und X⁵ für Wasserstoff oder eine Hydroxylschutzgruppe stehen, welche aus der Gruppe Acetyl, Benzoyl, t-Butyl, Trityl, Benzyl und Benzyloxycarbonyl ausgewählt ist, mit der Massgabe, dass mindestens einer der Reste X, X¹, X², X³, X⁴, X⁵ und X⁶ verschieden von Wasserstoff ist, und

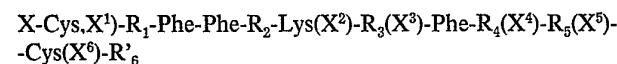
R₆ eine Hydroxygruppe, eine Methoxygruppe, eine Estergruppe, eine Amidgruppe oder eine Hydrazidgruppe, oder eine Gruppierung der Formeln:

-O-CH₂-Polystyrol-Harzträger oder

-O-CH₂-Benzylpolystyrol-Harzträger

darstellt.

2. Peptid nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es die Formel IIIa



aufweist, worin

R₆ für eine Gruppe der Formel:

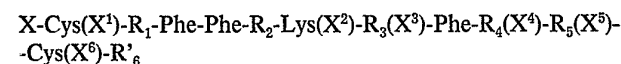
-O-CH₂-Polystyrol-Harzträger oder

-O-CH₂-Benzylpolystyrol-Harzträger

steht, und

Cys, Phe, Lys, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, X, X¹, X², X³, X⁴, X⁵ und X⁶ die gleiche Bedeutung aufweisen wie im Patentanspruch 1.

3. Verfahren zur Herstellung des Peptides der Formel IIIa

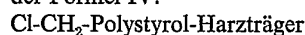


gemäss Patentanspruch 2, worin

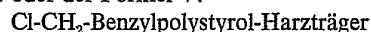
Cys, Phe, Lys, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, X, X¹, X², X³, X⁴, X⁵ und X⁶ die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Patentanspruch 2,

5 dadurch gekennzeichnet, dass man

a) durch Umsetzung eines chlormethylierten Harzträgers der Formel IV:



10 oder der Formel V:

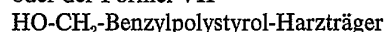


oder eines hydroxymethylierten Harzträgers der Formel VI



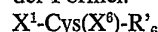
15

oder der Formel VII



mit einer N^α-geschützten D-Cys(X⁶)-aminosäure oder

20 L-Cys(X⁶)-aminosäure ein an das Harz gekuppeltes Produkt der Formel:



herstellt, worin

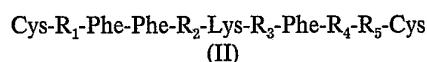
25 X¹ die Aminoschutzgruppe von Cys ist; und man

b) die Aminoschutzgruppe von L-Cys oder D-Cys entfernt, und

stufenweise die Aminosäuren in der Bedeutung von R₅(X⁵), R₄(X⁴), Phe, R₃(X³), Lys(X²), R₂, Phe, R₁ und X-Cys(X¹) an-

30 kuppelt und so das an das Harz gekuppelte Peptid der Formel IIIa erhält.

4. Verfahren zur Herstellung von Peptiden der Formel II

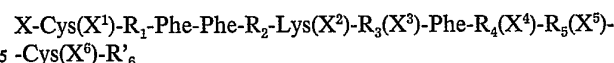


35

gemäss Patentanspruch 1, worin

Cys, Phe, Lys, R₁, R₂, R₃, R₄ und R₅ die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Patentanspruch 1,

40 dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren gemäss Patentanspruch 3 das an das Harz gekuppelte Peptid der Formel IIIa



45

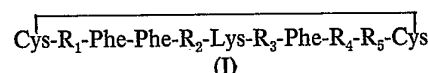
herstellt, worin

Cys, Phe, Lys, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, X, X¹, X², X³, X⁴, X⁵ und X⁶ die gleiche Bedeutung haben wie in Patentan-

50 spruch 3,

und dass man dieses an das Harz gebundene Peptid mit einem Reagens behandelt, welches das Peptid vom Harz spaltet und auch die übrigen allfällig vorhandenen Schutzgruppen abspaltet, und man so ein Peptid der Formel II erhält.

55 5. Verfahren zur Herstellung eines Peptides der Formel I

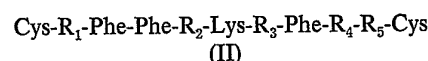


60

gemäss Patentanspruch 1, worin

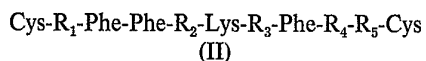
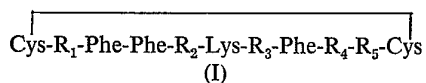
Cys, Phe, Lys, R₁, R₂, R₃, R₄ und R₅ die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Patentanspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren gemäss Patentanspruch 4 das Peptid der Formel II



herstellt, und dieses unter Bildung des Peptides der Formel I oxydiert.

6. Pharmazeutisches Präparat, dadurch gekennzeichnet, dass es als Wirkstoff ein Peptid der Formel I oder der Formel II



gemäss Patentanspruch 1 enthält, worin

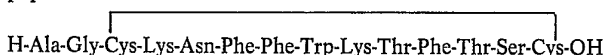
Cys, Phe, Lys, R₁, R₂, R₃, R₄ und R₅ die gleiche Bedeutung aufweisen wie in Patentanspruch 1.

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Peptide, die eine biologische Aktivität bezüglich der Hemmung der Sekretion von Wachstumshormon, Insulin und Glucagon besitzen.

Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung dieser neuen Peptide und pharmazeutische Präparate, welche diese enthalten.

Die erfindungsgemässen Peptide weisen weniger Aminosäure-einheiten auf als Somatostatin, und ihre Wirksamkeit besteht darin, dass sie die Freisetzung des Wachstumshormons durch die Hirnanhangdrüse hemmen und/oder die Freisetzung von Glucagon oder Insulin durch die Bauchspeicheldrüse. Verschiedene erfindungsgemässe Peptide haben eine getrennte biologische Aktivität bezüglich der Hemmung der Sekretion von Wachstumshormon, bzw. Insulin, bzw. Glucagon.

Ein Peptid mit einer hemmenden Wirkung auf die Sekretion von Wachstumshormonen ist bereits charakterisiert worden; es ist im US-Patent Nr. 3 904 594 auf Guillemin et al. beschrieben. Dieses Peptid erhielt den Namen «Somatostatin». Somatostatin (auch bekannt als Hemmungsfaktor bezüglich der Freisetzung von Somatotropin) ist das Tetradecapeptid

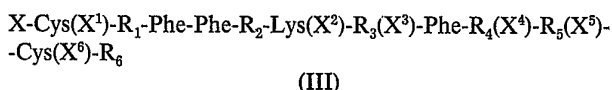
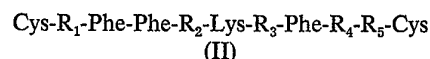
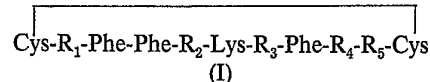


Somatostatin, die lineare Form von Somatostatin (Dihydrosomatostatin) und verschiedene acylierte Derivate von Somatostatin und Dihydrosomatostatin sind im oben erwähnten US-Patent beschrieben.

Somatostatin und viele Analoge von Somatostatin zeigen eine Aktivität bezüglich der Hemmung der Sekretion von Wachstumshormonen (GH) aus kultivierten, dispergierten Zellen des Hypophysenvorderlappens der Ratten in vitro und bezüglich der Hemmung der Sekretion von Insulin und Glucagon in vivo in der Ratte. Es wurde bei der Verwendung von Somatostatin als höchst wünschenswert erachtet, lediglich selektiv nur die Sekretion von Wachstumshormonen, Insulin oder Glucagon zu hemmen. Es wurden Anstrengungen unternommen, Analoge von Somatostatin zu entwickeln, welche losgelöste (dissociated) biologische Aktivität besitzen und lediglich die Sekretion von Wachstumshormonen, Insulin oder Glucagon hemmen. Obwohl es Veröffentlichungen gibt, welche Unterschiede in den Mengen von Somatostatin anführen, welche zur Hemmung von Insulin im Vergleich zu Glucagon im Menschen und durchtränkten Rattenbauchspeicheldrüsen in vitro erforderlich sind, zeigen Somatostatin und einige Somatostatinanaloge ähnliche Wirksamkeiten im Hinblick auf die Inhibierung dieser beiden Hormone in vivo.

Es wurde nun überraschenderweise festgestellt, dass gewisse Aminosäuren aus der Aminosäuresequenz des Somatostatins ausgelassen werden können und/oder eine Umordnung in der Aminosäuresequenz des Somatostatins, bzw. des Dihydrosomatostatins vorgenommen werden kann und man dabei neue Peptide erhält, welche weniger Aminosäuren in ihrer Struktur aufweisen, und welche eine biologische Aktivität bezüglich der Hemmung der Sekretion von Wachstumshormon, Insulin und Glucagon besitzen. Einige dieser neuen Peptide haben eine unterschiedliche Aktivität bezüglich der Hemmung der Sekretion der drei genannten Hormone.

Die neuen erfindungsgemässen Peptide entsprechen der Formel I, II oder III:



oder sind Salze dieser Peptide, worin

Cys entweder D-Cys oder L-Cys bedeutet,

Phe für L-Phe steht,

Lys für L-Lys steht,

R₁ L-AspNH₂ oder eine direkte Bindung bedeutet,

R₂ L-Try oder D-Try darstellt,

R₃ für L-Phe oder L-Thr steht,

R₄ L-Thr oder eine direkte Bindung bedeutet,

R₅ L-Ser, L-Phe oder eine direkte Bindung darstellt,

unter der Voraussetzung, dass mindestens einer der Reste R₁, R₄ und R₅ eine direkte Bindung bedeutet,

X für ein Wasserstoffatom oder eine α-Aminoschutzgruppe steht, welche eine Acylgruppe, z.B. eine aromatische, aliphatische oder cycloaliphatische Urethanschutzgruppe, eine Thiourethanschutzgruppe, eine substituierte Alkylschutzgruppe oder eine Trialkylsilylschutzgruppe ist,

X¹ und X⁶ für Wasserstoffatome oder für Schutzgruppen der SH-Gruppierung von D-Cys oder L-Cys stehen, die die Bedeutung von Benzyl, p-Methoxybenzyl, Acetamidomethyl oder Trityl aufweisen,

X² ein Wasserstoffatom oder eine Schutzgruppe für die in der Seitenkette von L-Lys befindliche Aminogruppe darstellt, welche eine Benzyl-, Chlorbenzyloxycarbonyl-, Benzyl-oxycarbonyl-, Tosyl-, t-Amyloxycarbonyl- oder t-Butyloxycarbonyl-schutzgruppe ist,

X³, X⁴ und X⁵ für Wasserstoff oder eine Hydroxylschutzgruppe stehen, welche aus der Gruppe Acetyl, Benzoyl, t-Butyl, Trityl, Benzyl und Benzyloxycarbonyl ausgewählt ist, mit der Massgabe, dass mindestens einer der Reste X, X¹, X², X³, X⁴, X⁵ und X⁶ verschieden von Wasserstoff ist, und R⁶ eine Hydroxygruppe, eine Methoxygruppe, eine Estergruppe, eine Amidgruppe oder eine Hydrazidgruppe, oder eine Gruppierung der Formeln:

-O-CH₂-Polystyrol-Harzträger oder

-O-CH₂-Benzylpolystyrol-Harzträger darstellt.

Von den neuen Peptiden der Formeln I, II oder III sind diejenigen besonders wichtig, die weniger Aminosäureeinheiten aufweisen als Somatostatin oder Dihydrosomatostatin, und zwar insbesondere wegen der relativen Einfachheit der Herstellungsverfahren für diese Peptide mit kürzerer Kette.

Wie man aus den Formeln I, II und III ersehen kann, kann der Rest R₃ sowohl L-Phe als auch L-Thr sein, wobei

jedoch diejenigen Verbindungen bevorzugt sind, in welchen R_3 für L-Thr steht.

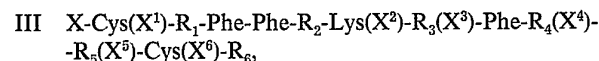
Eine der bevorzugten Gruppen von Peptiden der Formeln I, II, bzw. III, sind diejenigen, in welchen R_1 eine direkte Bindung darstellt, R_2 D-Try bedeutet, R_4 für eine direkte Bindung steht und auch R_5 für eine direkte Bindung steht. Von dieser Gruppe von Peptiden sind wiederum diejenigen bevorzugt, in welchen Cys die Bedeutung von D-Cys besitzt.

Eine weitere bevorzugte Gruppe an Peptiden ist diejenige, in welchen R_1 für L-AspNH₂ steht und R_2 für D-Try oder L-Try steht. Beispiele für derartige Peptide der Formeln I, II und III sind diejenigen, worin R_1 für L-AspNH₂ steht, R_2 für D-Try steht, R_4 eine direkte Bindung darstellt und R_5 ebenfalls eine direkte Bindung ist, bzw. diejenigen, worin R_1 für L-AspNH₂ steht, R_2 für L-Try steht, R_4 für L-Thr steht und R_5 eine direkte Bindung ist, bzw. diejenigen, worin R_1 für L-AspNH₂ steht, R_2 D-Try darstellt, R_4 = L-Thr bedeutet und R_5 eine direkte Bindung ist.

Die zur Beschreibung der Peptide der vorliegenden Erfindung verwendete Nomenklatur steht in Übereinstimmung mit der herkömmlichen Praxis, welche die ersten drei Buchstaben des Trivialnamens angibt. Ebenfalls in Übereinstimmung mit dieser Praxis will man die L-Form der Aminosäure ausdrücken, ausser etwas anderes sei ausdrücklich angegeben. In diesem Zusammenhang soll ebenfalls klargestellt werden, dass irgendeine der beiden Cys-Aminosäureeinheiten entweder D-Cys oder L-Cys bedeuten kann.

Pharmazeutisch annehmbare Säureadditionssalze der Peptide liegen ebenfalls innerhalb des Bereiches der vorliegenden Erfindung. Solche Säureadditionssalze können z.B. sein (sind aber nicht darauf beschränkt): Hydrochlorid, Hydrobromid, Sulfat, Phosphat, Maleat, Acetat, Citrat, Benzoat, Succinat, Malat, Ascorbat, Tartrat usw.

Als innerhalb des Bereiches der vorliegenden Erfindung werden ebenfalls Zwischenprodukte der folgenden Formel angesehen:



worin

X entweder Wasserstoff oder eine α -Aminoschutzgruppe darstellt. Die α -Aminoschutzgruppen, welche durch X bezeichnet werden, sind diejenigen, welche in der Technik der stufenweisen Synthese von Polypeptiden als brauchbar bekannt sind. Unter den Klassen von α -Aminoschutzgruppen, umfasst von X, befinden sich

(1) Acyl-artige Schutzgruppen, wie Formyl, Trifluoracetyl, Phthalyl, Toluolsulfonyl (Tosyl), Benzolsulfonyl, Nitrophenylsulfonyl, Tritylsulfonyl, o-Nitrophenoxycetyl, Chloracetyl, Acetyl, γ -Chlorbutyryl, usw.;

(2) Schutzgruppen vom Typus aromatische Urethane, wie Benzyloxycarbonyl und substituiertes Benzyloxycarbonyl, wie p-Chlorbenzyloxycarbonyl, p-Nitrobenzyloxycarbonyl, p-Brombenzyloxycarbonyl, p-Methoxybenzyloxycarbonyl;

(3) Schutzgruppen vom Typus aliphatische Urethane, wie α -t-Butyloxycarbonyl, Diisopropylmethoxycarbonyl, Isoproploxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, Allyloxycarbonyl;

(4) Schutzgruppen vom Typus Cycloalkylurethane, wie Cyclopentylloxycarbonyl, Adamantylloxycarbonyl, Cyclohexylloxycarbonyl;

(5) Thiourethan-artige Schutzgruppen, wie Phenylthiocarbonyl;

(6) substituierte Alkyl-Schutzgruppen, wie Triphenylmethyl (Trityl), Benzyl;

(7) Trialkylsilan-Gruppen, wie Trimethylsilan. Die bevorzugte, durch R definierte, α -Aminoschutzgruppe ist Tertbutyloxycarbonyl.

X^1 und X^6 bilden beide eine Schutzgruppe für Cys, welche aus der Gruppe S-p-Methoxybenzyl, S-p-Methylbenzyl, S-Acetamidomethyl, S-Trityl, S-Benzyl, usw. ausgewählt ist. Die bevorzugte Schutzgruppe ist S-p-Methoxybenzyl. X^1 und/oder X^6 können Wasserstoff sein, was bedeutet, dass keine Schutzgruppe auf der Schwefelgruppe vorhanden ist.

X^2 ist eine Schutzgruppe für den Seitenketten-Aminosubstituenten von Lysin, oder X^2 steht für Wasserstoff, was bedeutet, dass es keine Schutzgruppe auf dem Seitenketten-Aminosubstituenten gibt. Illustrativ für geeignete Seitenketten-Aminoschutzgruppen sind Benzyl, Chlorbenzyloxycarbonyl, Benzyloxycarbonyl, Tosyl, t-Amyloxycarbonyl, t-Butyloxycarbonyl usw. Die Auswahl einer solchen Seitenketten-Aminoschutzgruppe ist nicht kritisch, ausser dass sie von einer solchen Beschaffenheit sein muss, dass sie während der Entfernung der Schutzgruppen von den α -Aminogruppen während der Synthese nicht entfernt wird. Somit können die α -Aminoschutzgruppe und die Seitenkette-Aminoschutzgruppen nicht die gleichen sein.

X^3 , X^4 und X^5 sind Schutzgruppen für die Hydroxylgruppe von Thr und Ser und sie werden aus der Gruppe Acetyl, Benzoyl, tert-Butyl, Trityl, Tetrahydropyranyl, Benzyl, 2,6-Dichlorbenzyl und Benzyloxycarbonyl ausgewählt. Die bevorzugte Schutzgruppe ist Benzyl. X^3 und/oder X^4 und/oder X^5 können Wasserstoff sein, was bedeutet, dass auf der Hydroxylgruppe keine Schutzgruppe vorhanden ist.

R_1 , R_2 , R_3 , R_4 und R_5 sind wie oben definiert. R_6 ist aus der Klasse der folgenden Gruppen ausgewählt:

OH, OCH₃, Ester, Amide, Hydrazide und einer bei der Synthese in fester Phase verwendeten Benzylester- oder Hydroxymethylester-Verankerungsbindung, welche an einen durch die folgenden Formeln dargestellten festen Harzträger gebunden ist:

-O-CH₂-Polystyrol-Harzträger

und

O-CH₂-Benzyl-Polystyrol-Harzträger.

Das Polymer ist vorzugsweise ein Copolymer aus Styrol mit etwa 0,5 bis 2,0% Divinylbenzol als Vernetzungsmittel, was beim Polystyrol-Polymer eine vollständige Unlöslichkeit in gewissen organischen Lösungsmitteln hervorruft. In Formel III bedeutet mindestens einer der Reste X, X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 und X^6 eine Schutzgruppe.

Bei der Auswahl einer besonderen, bei der Synthese von Peptiden der Formel I oder der Formel II zu verwendende Seitenketten-Schutzgruppe sollten die folgenden Regeln befolgt werden:

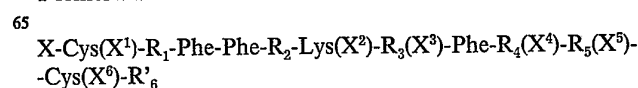
(a) die Schutzgruppe muss bezüglich des Reagenses und der zur Entfernung der α -Aminoschutzgruppe bei jeder Stufe der Synthese gewählten Reaktionsbedingungen stabil sein,

(b) die Schutzgruppe muss ihre schützenden Eigenschaften beibehalten und sie darf unter den Kupplungsbedingungen nicht abgespalten werden, und

(c) die Seitenketten-Schutzgruppe muss beim Abschluss der Synthese, welche die gewünschte Aminosäure-Sequenz enthält, unter den Reaktionsbedingungen, welche die Peptidkette nicht verändern, entferntbar sein.

Die Peptide der Formel I und Formel II können unter Verwendung der Synthese in fester Phase hergestellt werden.

Wenn die erfindungsgemässen Peptide nach der Synthese in fester Phase hergestellt werden, dann erhält man als Zwischenprodukt der Formel III eine Verbindung der folgenden Formel IIIa:



(IIIa)

worin

R'_6 für eine Gruppe der Formel
-O-CH₂-Polystyrol-Harzträger oder
-O-CH₂-Benzylpolystyrol-Harzträger
steht, und

Cys, Phe, Lys, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, X, X¹, X², X³, X⁴, X⁵
und X⁶ die weiter vorne angegebenen Bedeutungen besitzen.

Dieses bevorzugte Herstellungsverfahren für die Verbindungen der Formel IIIa wird durchgeführt, indem man:

1) durch Umsetzung eines chlormethylierten Harzträgers der Formel IV:

Cl-CH₂-Polystyrol-Harzträger

(IV)

oder der Formel V:

Cl-CH₂-Benzylpolystyrol-Harzträger

(V)

oder eines hydroxymethylierten Harzträgers der Formel VI

HO-CH₂-Polystyrol-Harzträger

oder der Formel VII

HO-CH₂-Benzylpolystyrol-Harzträger mit einer N^α-geschützten D-Cys(X⁶)-amino-säure oder L-Cys(X⁶)-amino-säure oder ein an das Harz gekuppeltes Produkt der Formel:

X¹-Cys(X⁶)-R'₆

herstellt, worin

X¹ die Aminoschutzgruppe von Cys ist; und man

2) die Aminoschutzgruppe von L-Cys oder D-Cys entfernt, und

stufenweise die Aminosäuren in der Bedeutung von R₅(X⁵), R₄(X⁴), Phe, R₃(X³), Lys (X²), R₂, Phe, R₁ und X-Cys(X¹) an-kuppelt und so das an das Harz gekuppelte Peptid der Formel IIIa erhält.

Bei diesem Syntheseverfahren kann also das Ausgangsmaterial hergestellt werden, indem man ein α-Amino und S-geschütztes Cys an ein chlormethyliertes Harz oder ein Hydroxymethylharz anknüpft. Die Herstellung des Hydroxymethylharzes wurde von Bodanszky et al., Chem. Ind. (London) 38, 1597-98 (1966) beschrieben. Ein chlormethyliertes Harz ist kommerziell erhältlich von Bio Rad Laboratories, Richmond, California; die Herstellung eines solchen Harzes wurde von Stewart et al., «Solid Phase Peptide Synthesis» (Freeman & Co., San Francisco 1969), Kapitel 1, Seiten 1-6 beschrieben. Das α-Amino und S-geschützte Cys wird an das chlormethylierte Harz gemäss dem Verfahren von Monahan und Gilon, Biopolymer 12, Seiten 2513-19, 1973 gebunden. Nach dem Zusammenfügen des α-Amino und S-geschützten Cys mit dem Harzträger wird die α-Aminoschutzgruppe entfernt, beispielsweise unter Verwendung von Trifluoressigsäure in Methylenchlorid, Trifluoressigsäure allein oder HCl in Dioxan. Die Entfernung der Schutzgruppe wird bei einer Temperatur zwischen etwa 0°C und Raumtemperatur ausgeführt.

Andere Standard-Spaltungsmittel und Standardbedingungen zur Entfernung von spezifischen α-Amino-Schutzgruppen können eingesetzt werden, wie sie in Schroder und Lubke, «The Peptides», 1 S. 72-75 (Academic Press 1965) beschrieben sind.

Nach der Entfernung der α-Aminoschutzgruppe vom Cys werden die übrigbleibenden α-Amino und Seitenketten-geschützten Aminosäuren stufenweise in die gewünschte Ordnung zusammengefügt, um eine Verbindung der Formel III zu erhalten; als Alternative zur getrennten Zugabe einer jeden Aminosäure zur Synthese können einige von ihnen vor der Zugabe in den Festphasenreaktor zusammengefügt werden. Die Auswahl eines geeigneten Kupplungsreagens liegt im Können des Fachmanns. Besonders geeignet als Kupplungsreagens ist N,N¹-Dicyclohexylcarbodiimid.

Die in der Synthese von Peptiden in fester Phase verwendeten Aktivierungsreagenzien sind in der Peptidchemie wohl bekannt. Beispiele von zweckmässigen Aktivierungsmitteln sind:

5 (1) Carbodiimide, wie N,N-Diisopropylcarbodiimid, N-Ethyl-N¹-(γ-dimethylaminopropylcarbodiimid);

(2) Cyanamide, wie N,N-Dibenzylcyanamid;

(3) Ketenimine;

(4) Isoxazoliumsalse, wie N-Ethyl-5-phenylisoxazolium-10 -3'-sulfonat;

(5) monocyclische, Stickstoff-haltige, heterocyclische Amide von aromatischem Charakter, welche 1-4 Stickstoffe im Ring enthalten, wie Imidazolide, Pyrazolide, 1,2,4-Triazolide. Spezifische, heterocyclische Amide, welche nützlich sind, sind beispielsweise N,N¹-Carbonyldiimidazol, N,N¹-Carbonyl-di-1,2,4-triazol;

(6) alkoxyliertes Acetylen, wie Ethoxyacetylen;

(7) Reagenzien, welche mit der Carboxyleinheit der Aminosäure ein gemischtes Anhydrid bilden, wie Ethylchlor-20 formiat und Isobutylchlorformiat und

(8) Stickstoff-haltige, heterocyclische Verbindungen mit einer Hydroxylgruppe auf einem Ringstickstoff, wie N-Hydroxyphthalimid, N-Hydroxysuccinimid und 1-Hydroxybenzotriazol. Andere Aktivierungsreagenzien und ihre Verwendung beim Zusammenfügen von Peptiden sind von Schroder und Lubke (siehe oben) in Kapitel III und von Kapoor, J. Pharm. Sci., 59, S. 1-27 (1970) beschrieben worden.

Jede geschützte Aminosäure oder Aminosäuresequenz wird in etwa 4fachem Überschuss in den Festphasenreaktor 30 eingeführt; die Kupplung wird in einem Medium von Dimethylformamid:Methylenchlorid (1:1) oder in Dimethylformamid:Methylenchlorid (1:1) oder in Dimethylformamid oder Methylenchlorid allein ausgeführt. In denjenigen Fällen, wo eine unvollständige Kupplung erfolgte, wird das Zusammenfügensverfahren vor der Entfernung der α-Amino-Schutzgruppe, vor der Kupplung mit der nächsten Aminosäure wiederholt. Der Erfolg der Kupplungsreaktion bei jeder Stufe der Synthese wird mittels der Ninhydrin-Reaktion verfolgt, wie dies von E. Kaiser et al., Analyt. Biochem. 34, 595 40 (1970) beschrieben worden ist.

Nachdem die gewünschte Aminosäure-Sequenz der Formel III synthetisiert worden ist, wird das Peptid durch Behandlung mit einem Reagens, wie flüssigem Fluorwasserstoff, vom Harzträger entfernt, welches nicht nur das Peptid 45 vom Harz spaltet, sondern auch alle übrigen Seitenketten-Schutzgruppen X¹, X², X³, X⁴, X⁵ und X⁶ und die α-Aminoschutzgruppe X abspaltet, um unmittelbar ein Peptid der Formel I zu erhalten. Peptide gemäss Formel II werden erhalten, indem man Peptide der Formel I in Übereinstimmung mit bekannten Verfahren oxidiert. Ein alternativer Weg besteht darin, das Peptid, welches an einen Harzträger gebunden ist, durch Alkoholyse vom Harz abzutrennen, worauf der wiedergewonnene C-endständige Methylester durch Hydrolyse in die Säure umgewandelt wird. Irgendeine Seitenketten-Schutzgruppe kann dann, wie vorher beschrieben, oder nach anderen Verfahren, wie katalytischer Reduktion (z.B. Pd auf BaSO₄) unter Verwendung von Bedingungen, bei welchen die Trp-Einheit erhalten bleibt, abgespalten werden. Wenn Fluorwasserstoff zur Spaltung verwendet wird, wird 60 Anisol als ein Spülmittel in das Reaktionsgefäss zugegeben.

Das oben diskutierte Syntheseverfahren in fester Phase ist in der Technik wohl bekannt und es ist im wesentlichen von Merrifield J. Am. Chem. Soc., 85, S. 2149 (1964) beschrieben worden.

65 Die Peptide der vorliegenden Erfindung, welche losgelöste Effekte bezüglich der Hemmung der Freisetzung des Wachstumshormons, von Insulin und Glucagon aufweisen, werden als besonders wichtig im Zusammenhang mit der Behand-

lung von Diabetes angesehen. Die traditionelle Ansicht bezüglich Diabetes bestand darin, dass eine Krankheit vorliegt, welche allein auf verringerte Insulinproduktion zurückzuführen ist. Nachdem umfassende Klinik- und Forschungsversuche durchgeführt worden waren, wurde ersichtlich, dass zusätzlich zur Verringerung der Sekretion von Insulin ein etwas mitwirkender Faktor bei Diabetes wirksam ist. Es ist bekannt, dass während Insulin normalerweise bei Diabetes unzureichend ist, Glucagon üblicherweise im Überschuss vorliegt. Es wird nun angenommen, dass bei Diabetes das Vorliegen von Glucagon ein mindestens so wichtiger Faktor wie das Fehlen von Insulin ist.

Die Tatsache, dass ein Mangel an Insulin normalerweise von einem Überschuss an Glucagon begleitet ist, hat bei der Untersuchung der Rolle von Glucagon bei Diabetes Schwierigkeiten bereitet. Während man leicht Extraquantitäten eines Hormons wie Insulin, zugeben kann, hat es sich als sehr schwierig erwiesen, die Konzentration an Glucagon herabzusetzen. Die Entdeckung von Somatostatin hat die Forschung im Hinblick auf die Rolle von Glucagon bei Diabetes erleichtert. Somatostatin hemmt sowohl die Freisetzung von Insulin als auch diejenige von Glucagon. Die Rolle von Somatostatin bei der Erforschung von Diabetes ist in einem Artikel detailliert beschrieben, welcher in Science, Bd. 188, S. 920-923, 30. Mai 1975 erschienen ist. Es gibt jedoch mehrere Probleme im Hinblick auf die Verwendung von Somatostatin als Behandlung bei Diabetes. Somatostatin hemmt die Freisetzung von Insulin neben der Freisetzung von Glucagon. Somit wurde die Notwendigkeit eines Peptides mit einer losgelösten Wirkung auf die Hemmung der Freisetzung von Insulin und Glucagon im Zusammenhang mit der Behandlung von Diabetes erkannt. Die neuen Peptide der vorliegenden Erfindung erzeugen solche trennenden (dissoziative) Effekte. Einige der erfindungsgemässen Peptide sind insbesondere wirksam bei der Hemmung der Sekretion von Glucagon, während sie eine weniger grosse Wirkung auf die Verhinderung der Insulinsekretion aufweisen.

Die erfindungsgemässen Peptide erzeugen den Nutzen von Somatostatin und bekannter Somatostatinanalogen, sie haben jedoch weniger Aminosäurekomponenten, z.B. 8 bis 10 Aminosäureeinheiten im Vergleich von 12 bis 14 Aminosäureeinheiten für die meisten bekannten Somatostatinanalogen. Demgemäss haben die erfindungsgemässen Peptide signifikante, ökonomische Vorteile, was auf die relative Einfachheit der Herstellung dieser Peptide zurückzuführen ist.

Die folgenden Beispiele illustrieren verschiedene Eigenschaften der vorliegenden Erfindung, es ist jedoch nicht beabsichtigt, in irgendeiner Weise den Bereich der Erfindung damit einzuschränken, welche in den Ansprüchen definiert ist.

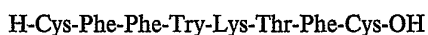
Beispiel 1

Die erfindungsgemässen Peptide werden durch Syntheseverfahren in fester Phase hergestellt, im allgemeinen in Übereinstimmung mit dem Verfahren, welches im US-Patent Nr. 3 904 595 beschrieben ist. Die Synthese wurde stufenweise auf chlormethyliertem Harz durchgeführt. Das Harz war aus feinen Perlen (20-70 Mikron im Durchmesser) aus einem synthetischen Harz zusammengesetzt, welches durch Copolymerisation von Styrol mit 1-2% Divinylbenzol hergestellt worden war. Die Benzolringe im Harz wurden in einer Friedel-Crafts-Reaktion mit Chlormethylmethyläther und Zinn(IV)chlorid chlormethyliert. Das somit eingeführte Chlor ist eine reaktive, Benzylchlorid-artige Bindung. Die Friedel-Crafts-Reaktion wird fortgesetzt, bis das Harz 0,5 bis 2 Millimole Chlor/g Harz enthält.

Bei der weiteren Beschreibung der Synthese der Peptide werden die verwendeten Reagenzien zuerst durch ihren che-

mischen Namen mit ihren gebräuchlichen Abkürzungen in Klammern beschrieben. Anschliessend wird das Reagens mit der gebräuchlichen Abkürzung bezeichnet werden.

Ein Peptid mit der Struktur:



wurde durch die folgende Verfahrensweise in fester Phase synthetisiert. Andere, nachfolgend beschriebene Peptide wurden gemäss ähnlichen Verfahren synthetisiert.

Das Tertiobutyloxycarbonyl-S-paramethoxybenzyl-Derivat (Boc-SpOMe-Bzl-Derivat von Cys) wurde durch irgendeines der drei bekannten Verfahren an das Harz gebunden;

(1) Erhitzen unter Rückfluss in Äthanol in Gegenwart von Triäthylamin;

(2) das Cäsiumsalz der Boc-geschützten Aminosäure wird über Nacht bei 50°C in Dimethylformamid (DMF) gehalten;

(3) das Kaliumsalz der Boc-geschützten Aminosäure wird während 2 Stunden bei 80°C in Dimethylsulfoxid (DMSO) gehalten.

Lediglich ein Milliäquivalent des geschützten Cys pro Milliäquivalent Cl auf dem Harz wurde verwendet.

Methode (3) wird nachfolgend detaillierter beschrieben. Zu einem Brei des Harzes und des aufgelösten geschützten Cys in DMSO werden 0,9 mEq Kaliumtertiobutoxid (KOT-But) pro mEq Aminosäure zugegeben. Die Reaktionsmischung wird so wenig wie nur möglich der Luft ausgesetzt, so dass keine bernsteinfarbige Verfärbung beobachtet wird. Die Reaktion bei 80°C während 2 Stunden ergibt ein geeignetes substituiertes Harz für die Synthese der Peptide (ungefähr 0,2 mEq Aminosäurederivat pro g Harz). Nach Entfernung der Schutzgruppen und Neutralisation wird die Peptidkette auf dem Harz aufgebaut. Das Entfernen der Schutzgruppen, die Neutralisation und Zugabe einer jeden Aminosäure wird in Übereinstimmung mit dem Schema I ausgeführt. Das N^α-t-Butyloxycarbonyl-Derivat (Boc-Derivat) einer jeden Aminosäure wird verwendet.

Nach Entfernung der Schutzgruppen des ersten Restes (d.h. SpOMe.Bzl.Cys) gemäss dem Schema I (Stufen 3 bis 4 und mit 8), wird das N Boc-Derivat von Thr als nächstes zusammen mit dem Kupplungsreagens zugegeben, welches Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) (Stufe 9 von Schema I) ist. Die Seitenkette von Thr wird mit o-Benzyläther (OBzl) geschützt. Benzyloxycarbonyl (Z) oder Benzyloxycarbonyl-2Cl [Z (2-CL)] wurde als Schutzgruppe für die Lys-Seitenkette verwendet.

I. Schema zum Zusammenfügen der Aminosäuren bei der Synthese in fester Phase (5-10 g Harz)

Stufe	Reagenzien und Operationen	Mischzeiten (Min.)
1	Waschen mit 80 ml CH ₂ Cl ₂ (zweimal)	3
2	Waschen mit 30 ml Methanol (MeOH) (zweimal)	3
3	Waschen mit 80 ml CH ₂ Cl ₂ (dreimal)	3
4	50% Trifluoressigsäure (TFA) mit einem Gehalt von 5% 1,2-Ethandithiol in CH ₂ Cl ₂ 70 ml (zweimal)	10
5	Waschen mit 80 ml CH ₂ Cl ₂ (zweimal)	3
6	Triethylamin (Et ₃ N) 12,5% in CH ₂ Cl ₂ 70 ml (zweimal)	5
7	Waschen mit 40 ml MeOH (zweimal)	2
8	Waschen mit 80 ml CH ₂ Cl ₂ (dreimal)	3
9	Boc-Aminosäure (10 mMole) in 10 ml DMF (einmal) und 30 ml CH ₂ Cl ₂ plus DCC (10 mMole) in CH ₂ Cl ₂ (2 m)	30 bis 120
10	Waschen mit 40 ml MeOH (zweimal)	3
11	Et ₃ N 12,5% in CH ₂ Cl ₂ 70 ml (zweimal)	3
12	Waschen mit 30 ml MeOH (zweimal)	3
13	Waschen mit 80 ml CH ₂ Cl ₂ (zweimal)	3

Nach Stufe 13 nimmt man ein Aliquot für einen Ninhydrintest:

Falls der Test negativ ist, geht man auf Stufe 1 zwecks Kupplung der nächsten Aminosäure zurück; falls der Test positiv oder leicht positiv ist, geht man auf die Stufen 9 bis 13 zurück. Schema I wurde zur Kupplung einer jeden der Aminosäuren des Peptides zu Cys verwendet.

Die Spaltung der Peptide vom Harz (5 g) und die Entfernung der Seitenketten-Schutzgruppen vom Peptid wurde in Fluorwasserstoffsäure (75 ml) in Gegenwart von Anisol (8 ml) ausgeführt. Nach der Entfernung der Fluorwasserstoffsäure unter Hochvakuum wurde das Harz-Peptid mit Ether gewaschen.

Das trockene Harz wurde sofort mit 25%iger Essigsäure (150 ml) extrahiert und mit entgastem H₂O (N₂) auf 3000 ml verdünnt. Der pH der Lösung wurde mit NH₄OH auf 6,6-7,0 eingestellt. Die Lösung wurde unter Rühren mit Kaliumferri-cyanid-Lösung (1 g/500 ml H₂O) tropfenweise titriert, bis eine permanente gelbe Farbe beobachtet wurde. Die Lösung setzte sich während 10 Minuten, und der pH wurde mit Eisessig auf 5,0 eingestellt. Bio Rad AG 3-X4A Harz (100-200 mesh, 0,074-0,147 mm lichte Maschenweite) Chloridform,

10-15 g wurde zur schlammigen Lösung zugegeben, und es wurde während 15 Minuten gerührt. Die Lösung wurde über Celite filtriert und nach und nach auf 2 Kolonnen aufgetragen;

- 5 a) Bio Rad AG 3-X4A Harz Chloridform (10 ml);
b) Bio Rex-70 Harz (100 ml) Kationform.

Der Celit- + Harzkuchen wurde durch und durch mit Wasser (500 ml) gewaschen und auf 2 Kolonnen a) und b) als Waschflüssigkeit aufgetragen. Das Peptidmaterial wurde dann aus der Bio Rex-70 Harz-Kolonne mit Pyridin:Essigsäure:Wasser (30:3:66) oder 50%iger Essigsäure eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt; lediglich die Peptid enthaltenden Fraktionen (Ninhydrin positiv) wurden mit Wasser verdünnt und sofort gefriergetrocknet. 950 mg rohes, cremiges, gefärbtes Material wurden erhalten. Es wurde auf eine Sephadex G-25 F Gelkolonne (3 × 200 cm) aufgetragen, ins Gleichgewicht gebracht und mit 2 n Essigsäure eluiert.

Die Elutionsprobe, beobachtet bei 280 nm, zeigte einen grösseren symmetrischen Peak. Nach dem Gefrier-trocknen ergab der Abschnitt im Zentrum 550 mg, welcher einer Gegenstromverteilung unterworfen wurde (Lösungsmittelsystem n-Butanol:Essigsäure:Wasser, 4:1:5) 10 ml niedrigere Phase pro Röhrchen. Es wurden 100 Überleitungen ausgeführt und in den Röhrchen 57-69 wurde der Hauptpeak gefunden. Die Verbindung (250 mg) erschien auf dem Dünnschichtchromatogramm homogen.

Die spezifische optische Rotation betrug $[\alpha]^{23}_D = -67,8 \pm 2$ (c=1) in 1% Essigsäure. Die Aminosäure-Analyse dieses Materials zeigte das erwartete Verhältnis für die verschiedenen Aminosäuren. Aktive Ester können in einer Synthese in fester Phase verwendet werden, und das klassische Syntheseverfahren kann ebenfalls zur Herstellung der erfindungsgemässen Peptide eingesetzt werden.

In vitro Bioversuch: Die Effekte der verschiedenen erfindungsgemässen Peptide wurden in vitro bezüglich der Sekretion von Wachstumshormon durch primäre Kulturen von enzymatisch dissoziierten, vorher Schleim absondernden Rattenzellen gemäss dem Verfahren von Vale et al., Endocrinology 91: S. 562-571 (1972) getestet. Der Versuch erfolgt in der Weise, dass man aus Ratten entfernte Schleim-absondernde Drüsen zwecks Abtrennung von Zellen daraus behandelt. Die Zellen wurden in Kulturplatten im Dulbecco's modifizierten Adlermedium (Dulbecco et al., Virology, Bd. 8, S. 396, 1949) gebracht. Kohlendioxidgas und Sauerstoff

wurden in die Zellkulturen geleitet, welche vor der Verwendung im Versuch während 4-5 Tagen bei 37°C gehalten werden. Nach den Veränderungen der Medien wurden die Zellkulturen 4 Stunden lang eingepflegt und besondere Somatostatinpeptide wurden dazugegeben. Die Radioimmunversuchsanalyse wurde zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Wachstumshormon-Sekretion eingesetzt, welche in Nanogramm pro Stunde ausgedrückt wird.

Eine Untersuchung des Effektes von Somatostatin, Dihydrosomatostatin, (als Kontrollen) und der erfindungsgemässen Peptide zwecks Verhinderung der Freisetzung von Glucagon und Insulin wurde wie folgt ausgeführt:

In vivo Bioversuch: «Sprague-Dawley-CD»-Ratten mit einem Gewicht von 180-200 g, welche in temperatur- und feuchtigkeitskontrollierten Abteilen mit 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit (Licht 0700-21100) hausten, wurden in allen Versuchen verwendet. Die Tiere wurden mit einer Standardration und Hahnwasser ad libitum gefüttert. Die Experimente wurden mindestens 5 Tage nach der Ankunft der Ratten vom Lieferanten zwischen den Stunden 1400 und 1600 ausgeführt. Nach den Etheranesthesien wurden Peptide oder Salz in einem Volumen von 0,2 ml via externe Drosselader verabreicht. Die Tiere blieben während der Zeit der Blutsammlung aus der Pfortader anesthesiert. Die Blut-

proben wurden in abgekühlte Röhren gebracht, welche 10 mg EDTA und 50 µl M Benzamidin pro ml Blut enthielten.

Das Plasma wurde bei -20°C für die Insulin- und Glucagonbestimmungen gelagert. Die Insulinniveaus wurden mittels der Methode von Herbert et al., J. Chem. Endocr. Metab. 25, 1375, 1965 unter Verwendung von Schweinsinsulinantiserum und (125I) iodiertem Insulintracer bestimmt. Der menschliche Insulinstandard wurde aus Schwarz-Mann, Orangeburg, New York erhalten. Das Glucagon wurde gemäss der Methode von Faloona und Unger, in Jaffe et al ed., «Methods of Hormone Radioimmunoassay», Academic Press, New York, 1974, S. 317 unter Verwendung von Glucagonantiserum 30K bestimmt. Die Cellulose wurde gemäss dem Glucose-Oxidase-Verfahren unter Verwendung eines «Beckman Glucose Analyzer» bestimmt.

Die Wachstumshormon-Bestimmungen wurden auf Gewebekulturbedien unter Verwendung der folgenden Reagenzien ausgeführt: NIAMDD Ratten GH-Standard (GH-RP-1), NIADD Affen Anti-Ratten-GH (GH-Serum-3) und hoch gereinigte Ratten-Wachstumshormone für die Iodierung.

Alle Versuche wurden in einem willkürlich hergestellten Blockplan ausgeführt. Nach der Analyse der Varianzdifferenz zwischen den Behandlungen wurden diese durch die Vielbereichstests von Dunnett und Duncan bestimmt. Die Werte der Wirksamkeit wurden aus 4- oder 6-Punkt-Bioversuchen berechnet.

Verschiedene erfindungsgemässe Peptide wurden gemäss der oben beschriebenen Verfahrensweise in fester Phase hergestellt. Die Zusammensetzung der Peptide wird nachfolgend in Tabelle I wiedergegeben. Tabelle I zeigt ebenfalls die prozentuale Wirksamkeit des Peptides bezüglich der Hemmung der Sekretion von Wachstumshormonen (GH), Insulin und Glucagon, wobei Somatostatin als Basis genommen wird.

TABELLE 1

Somatostatin (Kontrolle) Erfindungsgemässe Peptide					Wachstums- hormon 100	Insulin 100	Glucagon 100
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅			
DB	D-Try	L-Thr	DB	DB	6	80	100
DB	D-Try	L-Thr	DB	DB(D-Cys) ¹¹	14	100	100
DB	D-Try	L-Thr	L-Thr	DB	35	10-100	100
L-AspNH ₂	D-Try	L-Thr	DB	DB	1	100	1
L-AspNH ₂	L-Try	L-Thr	L-Thr	DB	3	100	1
L-AspNH ₂	D-Try	L-Thr	L-Thr	DB	10	200	10-100

DB bedeutet direkte Bindung, also das Fehlen der entsprechenden Aminosäure in der Sequenz

D-Cys¹¹ bedeutet, dass das Cys in der 11-Stellung der Aminosäuresequenz in der D-Form vorliegt.