



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 276 483 A1

4(51) C 07 K 7/06

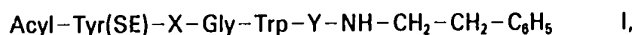
AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 07 K / 321 068 7	(22)	25.10.88	(44)	28.02.90
(71)	Humboldt-Universität zu Berlin, Direktorat für Forschung, Unter den Linden 6, Berlin, 1080, DD				
(72)	Henklein, Peter, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Bcomgarden, Monika, Dipl.-Chem.; Morgenstern, Rudolf, Dr. sc. med.; Ott, Tilmann, Prof. Dr. sc. med.; Ronneberger, Heike, DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung neuer Cholecystokininpentapeptide				

(55) Verfahren, Cholecystokinin, Antagonist, Peptidsynthese, Phenethylamidrest, Aminosäurereste, Medizin, Pharmazie

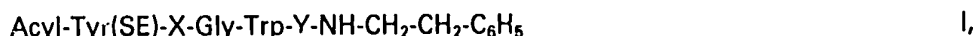
(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung neuer Antagonisten des Cholecystokinins der Formel I,



in der Acyl z. B. Asparaginsäure, Bernsteinsäure oder eine Schutzgruppe, wie Boc oder Z sein kann, SE einen Sulfatesterrest bedeutet, X für Thr, Nle, Leu oder Met und Y für Met, Nle oder Leu stehen kann. L-Trp in Formel I kann durch D-Trp ersetzt sein. Die Anwendungsgebiete der Erfindung sind die medizinische Forschung und die pharmazeutische Industrie.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung neuer Cholecystokininpentapeptide der allgemeinen Formel I,

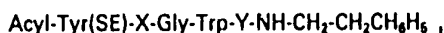


in der Acyl einen Aminosäurerest A oder einen Carbonsäurerest oder eine Schutzgruppe darstellt, SE für einen Sulfatesterrest am Tyrosin, X für einen Aminosäurerest B und Y für Met, Nle oder Leu stehen, **dadurch gekennzeichnet**, daß vom β -Phenethylamid (PEA) die Derivate Boc-Trp-X-PEA hergestellt, von der N-Schutzgruppe befreit, mit Boc-Tyr-X-Gly-ONB zu den Pentapeptiden Boc-Tyr-X-Gly-Trp-Y-PEA umgesetzt, die von der Schutzgruppe befreit, dann acyliert und anschließend sulfatiert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Aminosäurerest A vorzugsweise aus Asparaginsäure, der Carbonsäurerest vorzugsweise aus Bernsteinsäure, die Schutzgruppe z. B. aus t-Butyloxycarbonyl (Boc) oder Benzyloxycarbonyl (Z) bestehen und der Aminosäurerest B vorzugsweise Thr, Nle, Leu oder Met bedeutet.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß in den Verbindungen der Formel I L-Trp durch D-Trp ersetzt werden kann.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuartigen acylierten Cholecystokininssequenzen der allgemeinen Formel I



in der Acyl einen Aminosäurerest, vorzugsweise Asparaginsäure, oder einen Carbonsäurerest, vorzugsweise Bernsteinsäure, oder eine in der Peptidchemie gebräuchliche Schutzgruppe, vorzugsweise Butyloxycarbonyl (BOC) und Benzyloxycarbonyl (Z) darstellt und SE für einen Sulfatesterrest am Tyrosin steht. X steht für einen Aminosäurerest, vorzugsweise Thr, Nle, Leu oder Methionin und Y für Methionin, Norleucin oder Leucin. Zur besseren enzymatischen Stabilität kann anstelle von Trp auch D-Trp rein verwandt werden.

Derartige Peptide stellen neuartige wichtige Antagonisten des Cholecystokinins dar und sind wertvolle Hilfsmittel für pharmakologische Untersuchungen. Anwendungsgebiet der Erfindung sind die medizinische Forschung und die pharmazeutische Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Das gastrointestinale Peptidhormon Cholecystokinin (CCK) existiert in verschiedenen molekularen Formen, unter anderen als CCK-39, CCK-33, CCK-12 und CCK-8 (v. Mutt und E. Jorpes, Biochem. Journal 125, 57 1971).

Es zeigt eine Reihe wichtiger Effekte im Gastrointestinal-, Pankreas- und hepatobiliären System. So stimuliert es die Gallenblasenkontraktion und bewirkt die Relaxation des Sphincter oddi (Übersichten siehe J. E. Morley, Life Sci. 30, 479, 1982 und Nieber, K.; Henklein, P.; Ott, T. und P. Oehme Z. gesamte inn. Med. 42 [1987] 501).

Nach dem Auffinden von CCK im ZNS wurden weitere Effekte entdeckt. So spielt CCK unter anderem eine Rolle bei der Appetitsregulation, Analgesie, Ptose oder Katalepsie. Zur pharmakologischen Untersuchung all dieser Effekte sind Antagonisten wichtige Hilfsmittel. Die gegenwärtig bekannten Antagonisten des Cholecystokinins sind Derivate der Glutaminsäure – Proglumid – (A. L. Rovati, Minerva Medica 1967, 58, 3651; Macovec et al., Eur. J. Med. Chem.-chim. Ther. 21 [1986] 9), des Tryptophans – Benzotript – (Hahne, W. F. Jensen, T.; Lemp G. F. und J. D. Gardner 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. 78 [1987] 6304) bzw. verkürzte oder cyclische Sequenzen des Cholecystokinins (Spanarkel et al., J. Biol. Chem. 258, 6746 [1983]; M. Ch. Gaïas Am. J. Physiol. 254, G 176 [1988] sowie R. M. Freidinger et al., Proc. 19th. Europ. Peptid Symp. 1986 Porto Carras Griechenland, EP-SP 0132919).

Neuerdings fand man, daß 3substituierte Benzodiazepine ebenfalls peripher eine hohe antagonistische Aktivität besitzen (Chang R. U. Science 230 [1985] 177). Variationen der Substituenten führten zur weiteren Wirkungsverstärkung (Evans, B. E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, [1986] 4918; US-PS 4554272, US-PS 4563451, US-PS 4559338, EP-PS 166353, EP-PS 166354, EP-PS 167920, EP-PS 170024).

Kürzlich wurden auf der Basis von verkürzten Sequenzen neue wirksame Antagonisten entwickelt (WP 607 K/299762 und WP C07 K/299763). Alle bisher gefundenen Antagonisten auf Peptidbasis wiesen eine noch zu geringe antagonistische Aktivität auf (IC_{50} -Werte 10^{-6} bis 10^{-7} Mol).

Derivate des Benzodiazepins wirken nur peripher.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, neuartige Antagonisten des Cholecystokinins auf Peptidbasis herzustellen, die eine höhere antagonistische Aktivität besitzen als die vergleichbaren bekannten Antagonisten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Verfahren zu entwickeln, nach dem sich neuartige Sequenzen des Cholecystokinins (CCK) mit antagonistischen Eigenschaften herstellen lassen. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß C-terminal verkürzte Sequenzen synthetisiert wurden, denen die beiden C-terminalen Aminosäuren Asparaginsäure und Phenylalanin fehlen. Die Aminosäure Y, die jetzt als C-terminale Aminosäure steht, wurde in das β -Phenethylamid (PEA) umgewandelt. Die dadurch erhaltenen verkürzten CCK-Sequenzen zeigen überraschenderweise keinerlei CCK-Eigenschaften mehr, sind aber in der Lage, CCK in Konzentrationen von 10^{-8} bis 10^{-9} Mol/l zu hemmen. Die Verbindungen wurden peptidchemisch in üblicher Weise unter Verwendung bekannter Schutzgruppen hergestellt. Zu diesem Zweck wurde Boc-Trp-X- β -phenethylamid hergestellt, von der N-Schutzgruppe mit 2N HCl/Eisessig befreit und mit Boc-Tyr-X-Gly-ONB zum Pentapeptid umgesetzt. Das Pentapeptid Boc-Tyr-X-Gly-Trp-Y-PEA wird von der Boc-Schutzgruppe befreit, acyliert und anschließend mit Pyridiniumacetylsulfat sulfatiert. Die endgültige Reinigung erfolgt durch RP-18-Mitteldruckchromatographie isokratisch an 28% Acetonitril/0,05N Ammoniumacetatlösung pH 6,5. Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Beispiel 1

Suc-Tyr(SE)-Met-Gly-Trp-Met-NH-CH₂-CH₂-C₆H₅

Boc-Trp-Met-PEA

Das Dipeptid wurde durch Umsetzung von Boc-Trp-ONB mit H-Met-NH-CH₂-CH₂-C₆H₅ gewonnen.

Fp. 161–163 DC:CHCl₃/MeOH 9:1, R_f = 0,72

$[\alpha]_D^{20} = -14,37$ C = 1

SUC-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-PEA

5mMol Boc-Tyr-Met-Gly-ONB (hergestellt nach Henklein et al Z. Pharmazie 42, 414 [1987]) werden mit 5mMol H-Trp-Met-PEA in 30ml DHF umgesetzt. Das Lösungsmittel wird auf 1/4 des Volumens eingeeengt und das verbleibende Öl in 15% KHSC₄ eingerührt. Der Niederschlag wird getrocknet und von der Schutzgruppe durch Behandeln mit 10ml 2N HCl/Eisessig unter Zusatz von 0,5ml Mercaptoethanol entfernt.

Das rohe Hydrochlorid wird wie üblich mit Bernsteinsäureanhydrid in Pyridin/DMF acyliert.

Die Lösung wird eingeeengt, mit 0,1N HCl verrieben.

Der resultierende Rückstand wird abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

SUC-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-PEA MG = 1016

Fp. 144–50 (Zers.), R_f Essigester:Schwyzer Grundlösung (Pyr:HOAc:H₂O = 20:6:11) = 70:30

Suc-Tyr(SE)-Met-Gly-Trp-Met-PEA

MG 1097 Fp. 144–52°C (unter Erweichen)

HPLC: Säule ODS Hypersil 5µm 2,1 × 100mm

Laufmittel A: 0,01 H₃PO₄ pH 2,2/CH₃CN

Gradient 28–42% CH₃CN

Fluß 0,7ml; R_T = 1,18min

Laufmittel B: 0,01M Ammoniumacetat pH 4,13/25% CH₃CN R_T = 4,13min.

Beispiel 2

Am isolierten Meerschweinchenileum antagonisiert SUC-Tyr-(SE)-Met-Gly-Trp-Met-NH-CH₂-CH₂-C₆H₅ die kontraktionsauslösende Wirkung von CCK-8 kompetitiv. Die Substanz zeigte bis zu einer Konzentration von 10^{-6} Mol keine kontrahierende Wirkung. Der pA₂-Wert für SUC-Tyr(SE)-Met-Gly-Trp-Met-NH-CH₂-CH₂-C₆H₅ beträgt $8,04 \pm 0,19$ ($t_1 = 6$).