


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ³: C07C 103/52; A61K 37/02	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 81/00712 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. März 1981 (19.03.81)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE80/00126 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. September 1980 (04.09.80) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 29 36 099.4 (32) Prioritätsdatum: 6. September 1979 (06.09.79) (33) Prioritätsland: DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): TROPONWERKE GMBH & CO. KG [DE/DE]; Berliner Str. 156, D-5000 Köln 80 (DE).	(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRANTL, Victor [DE/DE]; Frauenplatz 10, D-8000 München 2 (DE). HENSCHENS, Agnes [DE/DE]; Max Planck Institut für Biochemie, Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried (DE). TESCHEMACHER, Hansjörg [DE/DE]; Pharmakolog. Institut der J. Liebig Universität, Frankfurter Str. 107, D-6300 Giessen (DE). LOTTSPREICH, Friedrich [DE/DE]; Max Planck Institut für Biochemie, Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried (DE). (74) Anwälte: WERNER, Hans-Karsten et al.; Deichmannhaus, D-5000 Köln 1 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, DK, JP, NO, SU, US. Veröffentlicht <i>Mit dem internationalen Recherchenbericht</i>	
(54) Title: PHARMACOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDES AND MEDICAMENTS CONTAINING THEM		
(54) Bezeichnung: PHARMAKOLOGISCH AKTIVE PEPTIDE UND DIESE ENTHALTENDE ARZNEIMITTEL		
(57) Abstract		
<p>The peptides of the formula Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C..., wherein Tyr represents tyrosin amino-acid and Pro represents prolin amino-acid, symbols A, B and C representing any amino-acid in its L- form and X representing any amino-acid in its D- form, have an opiated action and may used as medicaments, either in human or veterinary medicine.</p>		
(57) Zusammenfassung		
<p>Peptide der Formel Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C..., wobei Tyr gleich der Aminosäure Tyrosin und Pro gleich der Aminosäure Prolin ist, A, B, C jede beliebige Aminosäure in der L-Form und X jede beliebige Aminosäure in der D-Form ist, wirken opiatartig und können als Arzneimittel und Tierarzneimittel verwendet werden.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	KP	Demokratische Volksrepublik Korea
AU	Australien	LI	Liechtenstein
BR	Brasilien	LU	Luxemburg
CF	Zentrale Afrikanische Republik	MC	Monaco
CG	Kongo	MG	Madagaskar
CH	Schweiz	MW	Malawi
CM	Kamerun	NL	Niederlande
DE	Deutschland, Bundesrepublik	NO	Norwegen
DK	Dänemark	RO	Rumania
FI	Finnland	SE	Schweden
FR	Frankreich	SN	Senegal
GA	Gabun	SU	Soviet Union
GB	Vereinigtes Königreich	TD	Tschad
HU	Ungarn	TG	Togo
JP	Japan	US	Vereinigte Staaten von Amerika

Pharmakologisch aktive Peptide und diese enthaltende
Arzneimittel

Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue pharmakologisch aktive Peptide, insbesondere opiatartig wirkende, Verfahren zu deren synthetischer Herstellung, sowie nach diesen Verfahren hergestellte pharmakologisch aktive Peptide.

Es sind pharmakologisch aktive Peptide bekannt, welche in besonderen biologischen Testsystemen eine spezifische opiatartige Wirkung entfalten. Es sind dies insbesondere die von Hughes et al. (Nature 258, 577, 1975) aus dem Gehirn isolierten Pentapeptide: das Methionin- und das Leucinenkephalin sowie deren längerkettige Analoga. Diese bekannten Peptide und deren synthetische Derivate weisen den Nachteil auf, daß diese nach in vitro Behandlung mit Proteasen (z.B. Pronase E, Merck) nach kurzer Inkubationszeit ihre pharmakologische Wirkung, in diesem Fall eine opiatartige, verlieren. Bei in vivo Verabreichung werden diese Peptide durch körpereigene Proteasen leicht angegriffen und zerstört.

Auf der Tagung der Int. Narcotic Research Conference im Juni 1979, North Falmouth, USA, sind neue Peptide, β -Casomorphine beschrieben worden, welche eine neuartige Sequenz aufweisen, welche überraschenderweise aufgrund dieser Sequenz eine erhöhte Stabilität gegenüber Proteasen (z.B. Pronase E, Merck) aufweisen. Diese Peptide zeigen eine starke opiatartige Wirkung an verschiedenen bekannten Testsystemen (Rezeptorbindungstest und isolierter Meerschweinchendarm). Nach Injektion von 0,35 μ molen β -Casomorphin-5 (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly) in das Ventrikelsystem des Gehirns der Ratten zeigt sich eine starke, opiatspezifische Analgesie, welche innerhalb von 10 Minuten ihre maximale Wirkung erreicht hat und nach 60 Minuten völlig abgeklungen ist. Diese im Vergleich zu Morphin kurze Wirkungsdauer, bei gleicher Analgesie, deutet bereits auf einen möglichen völligen oder teilweisen Abbau der Substanz durch Enzyme des Gehirns hin.



-2-

Nach parenteraler oder oraler Applikation der Substanz zeigt das β -Casomorphin-5, welches übrigens das bisher stärkste bekannte opiatartig wirkende Peptid der β -Casomorphinfamilie ist, keine analgetische Wirkung. Die Dosis betrug bei diesen Versuchen bis zu 150 mg pro Kg Körpergewicht der Ratten. Dieser Nachteil der bekannten Peptide kann ganz oder teilweise auf die Inaktivierung der Substanz im Blut und/oder im Gehirn zurückgeführt werden. Inkubationsversuche der Substanz mit Rattengehirnhomogenat oder Blutplasma zeigten, daß schon nach kurzer Inkubationszeit von 15 Minuten die opiatartige Wirkung verschwindet.

Aufgabe der Erfindung ist es, neue pharmakologisch aktive Peptide zu schaffen, β -Casomorphine, Analoga und/oder Derivate, welche nach Inkubation (bis 120 Minuten) mit Rattengehirnhomogenat und/oder -homogenatüberstand und/oder Blutplasma (siehe Ausführungsbeispiel) ihre pharmakologische Wirkung, zum Beispiel die opiatartige, beibehalten. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es ferner, pharmakologisch aktive Peptide, β -Casomorphine, Analoga und/oder Derivate zu schaffen, welche nach parenteraler (z.B. intravenöser oder subcutaner Injektion) und/oder oraler Applikation eine pharmakologische Wirkung, insbesondere eine opiatartige zeigen. Aufgabe der Erfindung ist weiterhin, den Fachmann durch die Offenbarung der Aminosäuresequenz, insbesondere der Position der D-Aminosäure, in die Lage zu versetzen, mit üblichen Methoden das Peptid in beliebiger Menge herzustellen.

Diese Aufgabe ist gemäß der Erfindung dadurch gelöst, daß die pharmakologisch aktiven Peptide folgende Formeln aufweisen:

Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C...

wobei Tyr gleich der Aminosäure Tyrosin und Pro gleich der Aminosäure Prolin ist. A, B, C... kann jede beliebige Amino-



-3-

säure der stereochemischen L-Form sein. X kann jede beliebige Aminosäure der D-Form sein.

Nach einer Weiterbildung der Erfindung weisen die pharmakologisch aktiven Peptide folgende Formeln auf:

Tyr¹-X-A
Tyr¹-X-A-Pro
Tyr¹-X-A-Pro-B
Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro
Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C
Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C-Pro
Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C-Pro-D.....

Hierbei kann A, B, C, D... jede beliebige L-Aminosäure sein, auch Prolin und Tyrosin. X kann jede beliebige D-Aminosäure sein.

Nach einer anderen Weiterbildung der Erfindung bedeuten die Buchstaben A, B, C, D der aufgeführten Peptide:

X: D-Prolin
A: L-Phenylalanin
B: L-Glycin
C: L-Isoleucin
D: L-Asparagin

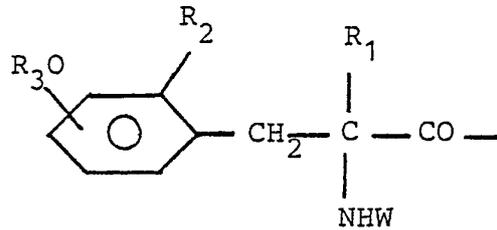
Nach einer besonders vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist X durch die D-Aminosäuren :D-Alanin, D-Threonin oder D-Valin ersetzt.

Nach einer anderen Weiterbildung ist



-4-

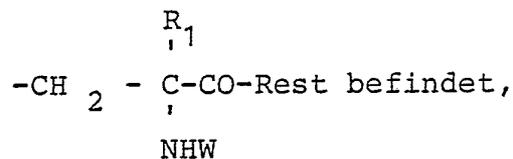
a) das endständige L-Tyrosin der allgemeinen Formel:



durch:

- R_1 für Wasserstoff oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen,
 R_2 für Wasserstoff oder zusammen mit R_1 für eine Aethylenbrücke,
 R_3 für Wasserstoff, eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen oder eine R_4CO -Gruppe,
 R_4 für einen gesättigten oder ungesättigten, geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 17 C-Atomen, einen Phenylrest oder einen Phenylalkylrest mit 7 bis 12 C-Atomen, wobei die Phenylreste durch 1 oder 2 Substituenten aus der Reihe Halogen, Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen oder Alkoxy mit 1 bis 4 C-Atomen substituiert sein können,

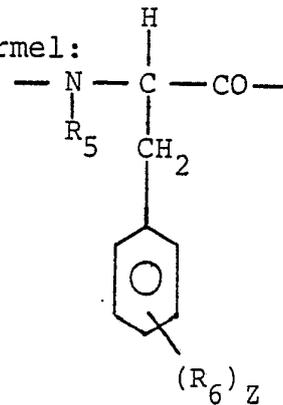
wobei die R_3O -Gruppe sich in meta- oder para-Stellung zum



- W für Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 5 C-Atomen, Alkenyl mit 3 bis 5 C-Atomen, Cyclopropylmethyl, Cyclobutylmethyl, R_4CO -, H-Lys-, H-Phe- oder H-Thyr, ersetzt.

-5-

b) das L-Phenylalanin der allgemeinen Formel:



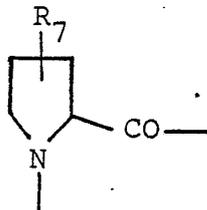
durch:

R_5 für Wasserstoff oder Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen,
 R_6 für Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Nitro, Alkyl
mit 1 bis 4 C-Atomen oder Alkoxy mit 1 bis 4
C-Atomen,

Z für 1 oder 2

ersetzt.

c) das L-Prolin (an den Positionen der Aminosäure 4,6,8...
des Peptids) der allgemeinen Formel:



so modifiziert, daß:

R_7 für Wasserstoff, eine Hydroxygruppe, eine Alkyl-
oder Alkoxygruppe mit 1 bis 4 C-Atomen steht,

- am Stickstoff eine Alkyl- oder Alkoxygruppe mit
1 bis 4 C-Atomen gebunden ist,

- eine oder mehrere Ketogruppen in den Ring einge-
führt sind.

d) die endständige, C-terminale Aminosäure ein Amid
oder Ester.

-6-

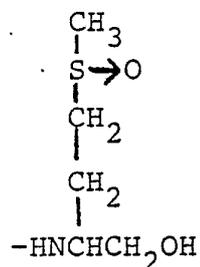
Die erhöhte Stabilität der erfindungsgemäßen Peptide gegenüber abbauenden Enzymen beruht auf dem Einbau einer D-Aminosäure in Position 2 des Peptids. Dieser Einbau war völlig fernliegend, da die Entdecker und Erstbeschreiber dieser Verbindungsklasse der β -Casomorphine auf der Internationalen Narcotic Research Conference, Juni 1979, North Falmouth, USA, berichteten, daß durch die alternierende Prolinsequenz eine völlig überraschende Stabilität gegenüber Peptidasen, z.B. Pro-nase E, Merck, resultiert. So lag es also völlig fern, eine weitere Stabilisierung gegen Proteasenspaltung vorzunehmen. Die D-Aminosäure in Position 2 des Peptids verhindert den Abbau durch natürliche Enzyme, da die natürlichen Enzyme bevorzugt Peptidbindungen zwischen L-Aminosäuren spalten.

Nach einer anderen Weiterbildung der Erfindung ist die C-terminale Aminosäure eines ungeradzahligen Peptids Methionin.

Besonders vorteilhaft ist die Aminosäure Methionin in C-terminaler Position bei Penta, Hepta und Nonapeptiden.

(Die C-terminale Aminosäure steht immer rechts vom Tyr¹.)

Sehr günstig ist die Derivatisierung des Methionins. Dabei liegt das C-terminale Methionin als -Met(O)-OH vor:



Diese Derivatisierung erbringt eine Verstärkung der opiat-artigen Wirkung mit sich, das heißt mit kleineren Dosen der Peptide können stärkere Wirkungen erzielt werden.

-7-

Nach einer Weiterbildung der Erfindung werden die erfindungsgemäßen pharmakologisch aktiven Peptide mit einem in der Peptidchemie und/oder in der Natur üblichen Verfahren synthetisiert.

Unter üblichen Verfahren wird das Einführen sowie das Abspalten von Schutzgruppen (z.B. der Schutz der Aminogruppe durch Carbobenzoylchlorid; der Schutz von Säuregruppen als Ester) während der Synthese verstanden. Üblich sind ebenfalls Synthesen an Trägermaterialien wie z.B. Polystyrol.

Nach einer Weiterbildung der Erfindung werden die pharmakologisch aktiven Peptide durch Knüpfen der Peptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren und/oder den kleineren Peptidfragmenten mit den üblichen Methoden erzeugt.

Arzneimittel und Tierarzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß diese, die in den Ansprüchen 1 - 10 beschriebenen pharmakologisch aktiven Peptide und/oder deren Derivate und/oder deren Säureadditionssalze und/oder deren Metallkomplexe enthalten.

Diese Säureadditionssalze können vorzugsweise Hydrochloride, Lactate oder Citrate sein. Als Metallkomplexe können Zink-, Magnesium- und Cobaltverbindungen verwendet werden. Als Derivate sind sämtliche Verbindungen zu verstehen, die als Grundgerüst die erfindungsgemäße Peptidsequenz der L-Aminosäuren mit Einbau einer D-Aminosäure in der Position 2 aufweisen und durch Substitution einzelner anhängender Gruppen Variationen erzielt werden. Die dabei erzielte positive oder negative Auswirkung auf die jeweils gewünschte Wirkung kann dann in den jeweiligen Tests einfach festgestellt werden.

Diese Arzneimittel können insbesondere als Antitussiva, Antidiarrhoeica, Analgetica, Antipsychotica, Tranquilizer Verwendung finden.

Beispiel

Synthese eines erfindungsgemäßen Pentapeptids der Sequenz: Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-Methylester
und Tyr-D-Pro-Phe-Pro-Gly-Methylester

A Syntheseplan: Die Aminokomponente wird bei -15°C oder niedriger in Dimethylformamid (DMF) mit einem 0,5 molaren Überschuß an gemischtem Anhydrid einer Z-Aminosäureisobutylcarbonsäure (wobei Z als Schutzgruppe dient und einen N-Benzylloxycarbonyl-Rest darstellt) 2 - 4 Stunden umgesetzt.

Das gemischte Anhydrid wird in DMF bei -15°C oder niedriger in 10 bis 15 Minuten unter Einsatz eines 6%-igen Überschusses am Z-Aminosäurederivat und N-Methylmorpholin über den Chlorameisensäureisobutylester gebildet. Der Überschuß an gemischtem Anhydrid wird dann zerstört. Bei 0°C wird der pH des Reaktionsproduktes mit wässriger, gesättigter KHCO_3 Lösung auf 8 eingestellt und 30 Minuten bei 0°C gerührt.

Die Peptide wurden mit Ethylacetat extrahiert. Das Ethylacetat/Peptidgemisch wurde, um das Z-Aminosäure-Kaliumsalz zu entfernen, 3 mal mit Natriumchlorid/Wasser, 3 mal mit Wasser gewaschen und abgedampft. Das so erhaltene Peptid, welches noch die Schutzgruppe Z trägt, wurde in Methanol hydriert. Dabei wurden 100-500mg Pd/Aktivkohle Katalysator pro mmol Peptid zugesetzt. Die CO_2 -Abspaltung wurde mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ Lösung kontrolliert. Der Katalysator wurde abfiltriert (Schleicher & Schüll Papierfilter N^o 595), mit Wasser ausgiebig gewaschen, und das Filtrat auf einem Rotationsverdampfer (Büchi, Rotavapor RE) eingedampft. Das gewünschte deblockierte Peptid ist im Rückstand.

-9-

B Synthese des Pentapeptids
 Tyr-D-Ala-Phe-Pro-Gly-Methylester und
 Tyr-D-Pro-Phe-Pro-Gly-Methylester

Stufe 1: a) Herstellung des gemischten Anhydrids.
 (Z-Phe-Pro-gemischtes Anhydrid)

640 mg (1,6 mM; = 6%-iger Überschuß) des Dipeptids Z-L-Phe-L-Pro (wobei Z ein N-Benzyloxycarbonyl-Rest ist, welcher als Schutzgruppe fungiert) werden in 20 ml Dimethylformamid (DMF) mit 200 μ l (1,5 mM) Chlorameisensäureisobutylester bei -15°C nach Zusatz von 170 μ l (1,6 mM) N-Methylmorpholin 15 Minuten umgesetzt.

b) Vorbereitung der Aminokomponente.
 125,6 mg (1,0 mM) Glycinmethylesterhydrochlorid werden in 20 ml DMF unter Zusatz von 110 μ l (1 mM) N-Methylmorpholin bei -15°C aufgelöst.

Stufe 2: Umsetzung des gemischten Anhydrids der Stufe 1 a mit der Aminokomponente 1 b. Das Z-Phe-Pro-gemischte Anhydrid wird mit dem Glycinmethylester in 40 ml DMF bei -15°C 4 Stunden umgesetzt.

Z-Phe-Pro-gem. Anhydrid+Gly-Metester $\xrightarrow[-15^{\circ}\text{C}]{4\text{ h}}$

Z-Phe-Pro-Gly-Metester

Vor der Aufarbeitung wird der 50%-ige Überschuß an gemischtem Anhydrid zerstört. Bei 0°C wird der pH des Reaktionsproduktes mit wässriger, gesättigter KHCO_3 -Lösung auf pH 8 eingestellt und 30 Minuten bei 0°C gerührt.



-10-

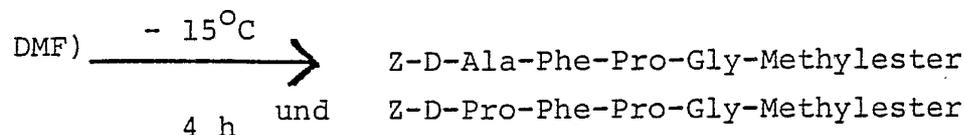
Danach wird das Peptid mit 50 - 100 ml Ethylacetat (EtAc) extrahiert; das EtAc/Peptidgemisch wird mit gesättigter, wässriger Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach einem weiteren abschließenden Waschen mit Wasser wird die EtAc-Phase eingedampft.

Stufe 3: Abspalten der Schutzgruppe durch Hydrierung. Das Peptid wird in 30 ml Methanol gelöst und 100 mg Palladium auf Aktivkohle (Merck) zugegeben. Nach dem Verdrängen der Luft durch Stickstoff wird in das Reaktionsgefäß Wasserstoff eingeleitet. Die Hydrierung wird bei 25°C - 30°C durchgeführt. Die Hydrierung ist beendet, wenn kein CO₂ mehr freigesetzt wird, d.h. wenn nach Kontrolle in wässriger Bariumhydroxid-Lösung kein Niederschlag mehr gebildet wird. Die Lösung wird filtriert, mit Wasser gewaschen und am Rotationsverdampfer einrotiert. Dieses verbleibende Zwischenprodukt wird dann in Stufe 4 als Aminokomponente eingesetzt.

Stufe 4: a) Herstellung des gemischten Anhydrids Z-D-Ala- und Z-D-Pro-gem. Anhydrid
334.8 mg Z-D-Ala (entsprechend auch Z-D-Pro) werden in 15 ml DMF unter Zusatz von 170 µl (1.5 mM) N-Methylmorpholin gelöst und mit 180 µl (1,4 mM) Chlorameisensäureisobutylester bei -15°C 15 Minuten umgesetzt.

b) Umsetzung des gemischten Anhydrids aus der Stufe 4 a mit der Aminokomponente der Stufe 3.

Z-D-Pro oder Z-D-Ala -Anhydrid+Phe-Pro-Gly-Metester (in 15 ml



-11-

(Die Herstellung des Z-D-Ala und des Z-D-Pro ist am Ende der Synthese aufgeführt.)

Die Zerstörung des überschüssigen gemischten Anhydrids, die Extraktionsschritte, die Hydrierung werden identisch wie vorher beschrieben durchgeführt.

Das Endprodukt 4 b dient als Aminokomponente für die Stufe 5. Eine Kontrolle der Aminosäurezusammensetzung nach Hydrolyse ergab die richtige molare Aminosäurerelation dieses Peptids. Ein Test auf die Opiataktivität (Testmethode siehe Beispiel I) ergab keinerlei opiatartige Wirkung.

- Stufe 5: a) Bildung des gemischten Anhydrids (Z-Tyr-gem. Anhy.) 629,24 (1,4 mM) N,O-di-Z-L-Tyrosin werden in 15 ml DMF unter Zusatz von 165 μ l (1,4 mM) N-Methylmorpholin gelöst und mit 175 μ l (1,3 mM) Chlorameisensäureisobutylester bei -15°C 15 Minuten umgesetzt.
- 5: b) Umsetzung des gemischten Anhydrids aus Stufe 5 a mit dem Endprodukt der Stufe 4 b.
Das Endprodukt der Stufe 4 b wird in 15 ml DMF gelöst und mit dem gemischten Anhydrid der Stufe 5 a bei -15°C , 4 Stunden umgesetzt. Die Zerstörung des überschüssigen gemischten Anhydrids, die Extraktion und die Hydrierung erfolgen wie oben beschrieben.

Eine nachfolgende Auftrennung der Reaktionsprodukte mittels Gelfiltration auf einer Biogel P 2 Säule (Fa. Biorad) < 400 mesh, Durchmesser 20 mm, Länge 1170 mm, Flußgeschwindigkeit 12 ml pro Stunde, mit Ultraviolettmessung bei 280 nm, und einem Fraktionskollector (je 20 min/Frak.) wurde durchgeführt. Alle Fraktio-



-12-

nen der Gelfiltration wurden an einem in einem Organbad aufgehängten Längsmuskel-Plexus-Myentericus-Präparat auf ihre opiatartige Wirkung getestet. Für diesen Text wurden die einzelnen Fraktionen unter Vakuum eingedampft.

Nach der Aufnahme der Rückstände in Wasser wurden Teile dieser Proben dem Organbad zugesetzt und auf ihre hemmende Wirkung auf die elektrisch stimulierten Kontraktionen des Meerschweinchendarmpräparates getestet. Die hemmende Wirkung der zu testenden Stoffe wurde als opiatspezifisch betrachtet, wenn diese nach Zugabe des spezifischen Opiatantagonisten Naloxon aufgehoben wurden, und nach weiterem Zusatz von Naloxon keine Hemmung durch die Probe mehr hervorgerufen wurde. Präparation und elektrische Stimulation des Meerschweinchendarms (Frequenz 0,1 Hz, Pulse 60 V, 0,5 ms) wurden durchgeführt, wie von Kosterlitz et al. (Kosterlitz H.W., Lydon, R.J., Watt, A. J. Brit. J. Pharmacol. 39, 398-413 (1970) und Schulz und Goldstein (Schulz R., Goldstein, A. J. Pharmacol. exp. Ther. 183, 404-410 (1972) beschrieben.

Die opiataktiven Fraktionen wurden zum Trocknen gebracht.

Eine nach der sauren Hydrolyse durchgeführte Aminosäureanalyse der opiataktiven Fraktion ergab ein richtiges molares Aminosäureverhältnis entsprechend den beiden Peptiden $D\text{-Ala}^2\text{-}\beta\text{-Casomorphin-5}$ und $D\text{-Pro}^2\text{-}\beta\text{-Casomorphin-5}$.

Es sei darauf hingewiesen, daß bereits die Aktivierung des opiatinaktiven Tetrapeptids (Stufe 4 b) durch Tyrosinkopplung in ein opiataktives Peptid den Nachweis der erfolgreichen Synthese darstellt.



-13-

Herstellung von Z-D-Ala (analog Z-D-Pro)

10 mM D-Ala (891 mg), in 5 ml 2 n NaOH, werden unter Eiskühlung und kräftigem Rühren mit 3 ml 50 % Chlorameisensäurebenzylester in Toluol und mit 5.16 ml 2 n NaOH behandelt.

Die Lösung wird mit 5.33 ml 2n HCl angesäuert und ausgiebig mit Ethylacetat extrahiert. Die abgetrennte Ethylacetat-Phase wird mit HCl (verd.) und Wasser gewaschen und schließlich mit viel KHCO_3 -Lösung extrahiert. Die vereinigten wässrigen Auszüge werden auf pH 1,5 mit HCl gebracht und mit Ethylacetat extrahiert. Die Ethylacetat-Phase wird wiederum mit verdünnter HCl gewaschen. Nach einem weiteren Waschvorgang mit Wasser wird über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels bleibt das gewünschte Endprodukt zurück.

-14-

Nachweis der Stabilität der opiatartigen Wirkung bei Inkubation mit Rattengehirnhomogenat des D-Ala²- β -Casomorphin-5.

Zwei durch Dekapitation getöteten Ratten (männl. Sprague Dawley, 220 g Gewicht) wird rasch das Gehirn, einschließlich Kleinhirn, entnommen und in einen eisgekühlten, mit 7 ml 0.05 M NaH₂PO₄ Puffer gefüllten Homogenisator (Nr. S 587, Vol. 35 ccm, Braun, Melsungen) eingebracht. Die Homogenisation erfolgt dann bei einer Umdrehungszahl von 850 U/min unter zehnmaligem Auf- und Abbewegen des Homogenisatorstempels. Ein kleiner Teil des Homogenats wird entnommen und auf Eis gelagert. Der Rest wird bei 5°C 15 Minuten lang bei 28 000 x g zentrifugiert. Sowohl das Homogenat vor der Zentrifugation als auch der klare Überstand nach der Zentrifugation werden für die nachfolgenden Inkubationen verwendet.

Alle Inkubationen der Substanzen mit Hirnhomogenat und -überstand erfolgen bei 37°C. Die jeweilige Inkubationszeit wird durch 10 minütiges Erhitzen bei einer Temperatur von 95°C beendet. Dieses Erhitzen auf 95°C dient dazu, noch vorhandene Enzyme zu zerstören, welche das biologische Nachweissystem für die opiatartige Wirkung beeinträchtigen könnten.

1-2 mg jeweils von β -Casomorphin-5 und dem erfindungsgemäßen D-Ala²- β -Casomorphin-5 werden in 50 μ l H₂O aufgenommen und mit je 300 μ l Gehirnhomogenat und -überstand vermischt. Je eine Probe wird vor dem Inkubieren bei 37°C sofort auf 95°C erhitzt. Diese Proben waren also nur sehr kurze Zeit mit den aktiven Enzymen in Kontakt und deren Gehalt an opiatartiger Wirkung dient als Bezugswert bei Zeitpunkt Null.



- 15 -

Nach jeweils 15, 30, 60 und 120 Minuten werden weitere Proben der beiden inkubierten Opiate dem Inkubator entnommen und auf 95°C erhitzt.

Als Nachweissystem, welches die Opiatmengen auch quantitativ erfaßt, dient der auf Seite 16 beschriebene Meer-schweinchendarmtest.

Ein Test auf den Gehalt an opioiden Material in den einzelnen Gefäßen ergab, daß die Gefäße, welche nur kurze Zeit (Nullwert) den Enzymen ausgesetzt waren, für beide der eingesetzten Opiate den gleichen Gehalt an Aktivität aufwiesen. Aber bereits nach 30 Minuten zeigten die Gefäße, welche das β -Casomorphin-5 enthielten, keine opiatartige Wirkung mehr, während jedoch der volle Gehalt an opiatartiger Wirkung beim D-Ala²- β -Casomorphin-5 sowohl nach 30 Minuten als auch nach 120 Minuten Inkubation nachweisbar war. Das Peptid mit der D-Aminosäure zeigt somit eine erstaunliche Stabilität gegenüber von peptidspaltenden Enzymen.

Mit den D-Ala²- und D-Pro²- β -Casomorphinen konnte bei systemischer Applikation (intravenöse und subcutane Injektion) eine analeptische Wirkung erzielt werden, was mit den entsprechenden L-Verbindungen nicht möglich war. Die Dosierung lag, entsprechend der geringeren Wirkung als Morphin, höher.

-16-

Analog dem oben aufgeführten Inkubationsbeispiel wurde beim Test der Stabilität der opiatartigen Wirkung gegenüber Blutplasma verfahren. Dabei wurden statt der 300 µl Homogenat 300 µl frisch gewonnenes Rattenblutplasma eingesetzt. Wieder zeigte sich, daß das β -Casomorphin-5 ohne die D-Aminosäure bereits nach 30 Minuten zerstört ist, während das D-Ala²- β -Casomorphin-s seine volle Wirkung behalten hat.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel und Tierarzneimittel sind pharmazeutische Zubereitungen, die neben nichttoxischen, inerten, pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen einen oder mehrere erfindungsgemäße Wirkstoffe enthalten, oder die aus einem oder mehreren erfindungsgemäßen Wirkstoffen bestehen.

Zur vorliegenden Erfindung gehören auch pharmazeutische Zubereitungen in Dosierungseinheiten. Dies bedeutet, daß die Zubereitungen in Form einzelner Teile, z.B. Tabletten, Dragees, Kapseln, Pillen, Suppositorien und Ampullen vorliegen, deren Wirkstoffgehalt einem Bruchteil oder einem Vielfachen einer Einzeldosis entsprechen. Die Dosierungseinheiten können z.B. 1, 2, 3 oder 4 Einzeldosen oder 1/2, 1/3 oder 1/4 einer Einzeldosis enthalten. Eine Einzeldosis enthält vorzugsweise die Menge Wirkstoff, die bei einer Applikation verabreicht wird und die gewöhnlich einer ganzen, einer halben oder einem Drittel oder einem Viertel einer Tagesdosis entspricht.

Unter nichttoxischen, inerten pharmazeutisch geeigneten Trägerstoffen sind feste, halbfeste oder flüssige Verdünnungsmittel, Füllstoffe und Formulierungshilfsmittel jeder Art zu verstehen.



- 17 -

Als bevorzugte pharmazeutische Zubereitungen seien Tabletten, Dragees, Kapseln, Pillen, Granulate, Suppositorien, Lösungen, Suspensionen und Emulsionen, Pasten, Salben, Gele, Cremes, Lotions, Puder und Sprays genannt.

Tabletten, Dragees, Kapseln, Pillen und Granulate können den oder die Wirkstoffe neben den üblichen Trägerstoffen enthalten, wie Füll- und Streckmittel (z.B. Stärken, Milchzucker, Rohrzucker, Glukose, Mannit und Kieselsäure), Bindemittel (z.B. Carboxymethyl-cellulose, Alginate, Gelatine, Polyvinylpyrrolidon), Feuchthaltemittel (z.B. Glycerin), Sprengmittel (z.B. Agar-Agar, Calciumcarbonat und Natriumbicarbonat), Lösungsverzögerer (z.B. Paraffin) und Resorptionsbeschleuniger (z.B. quarternäre Ammoniumverbindungen), Adsorptionsmittel (z.B. Kaolin und Bentonit) und Gleitmittel (z.B. Talkum, Calcium- und Magnesiumstearat und feste Polyethylenglykole) oder Gemische der aufgeführten Stoffe.

Die Tabletten, Dragees, Kapseln, Pillen und Granulate können mit den üblichen, gegebenenfalls Opakisierungsmittel enthaltenden Überzügen und Hüllen versehen sein und auch so zusammengesetzt sein, daß sie den oder die Wirkstoffe nur oder bevorzugt in einem bestimmten Teil des Intestinaltraktes, gegebenenfalls verzögert, abgeben, wobei als Einbettungsmassen z.B. Polymersubstanzen und Wachse verwendet werden können.

Der oder die Wirkstoffe können gegebenenfalls mit einem oder mehreren der oben angegebenen Trägerstoffe auch in mikroverkapselter Form vorliegen zur Erzielung eines Retardeffektes.



- 18 -

Suppositorien können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen wasserlöslichen oder wasserunlöslichen Trägerstoffe enthalten, z.B. Polyethylenglykole, Fette, z.B. Kakaofett und höhere Ester (z.B. C₁₄-Alkohol mit C₁₆-Fettsäure) oder Gemische dieser Stoffe.

Salben, Pasten, Cremes und Gele können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen Trägerstoffe enthalten (z.B. tierische und pflanzliche Fette, Wachse, Paraffine, Stärken, Tragant) oder Gemische dieser Stoffe.

Lösungen und Emulsionen können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen Trägerstoffe wie Lösungsmittel, Lösungsvermittler und Emulgatoren, z.B. Wasser, Ethylalkohol, Isopropylalkohol, Ethylcarbonat, Ethylacetat, Benzylalkohol, Benzylbenzoat, Propylenglykol, Öle, insbesondere Baumwollsaatöl, Erdnußöl, Maiskeimöl, Olivenöl und Sesamöl, Glycerin, Polyethylenglykole oder Gemische dieser Stoffe enthalten.

Zur parenteralen Applikation können die Lösungen und Emulsionen auch in steriler und blutisotonischer Form vorliegen.

Suspensionen können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen Trägerstoffe wie flüssige Verdünnungsmittel (z. B. Wasser, Ethylalkohol, Propylenglykol), Suspendermittel (z.B. ethoxylierte Isostearylalkohole, Polyoxyethylensorbit- und Sorbitanester, mikrokristalline Cellulose) oder Gemische dieser Stoffe enthalten.

Die genannten Formulierungsformen können auch Farbstoffe, Konservierungsstoffe sowie geruchs- und geschmacksverbessernde Zusätze, z.B. Pfefferminzöl und Eukalyptusöl und Süßmittel, z.B. Saccharin, enthalten.

-19-

Die therapeutisch wirksamen Verbindungen sollen in den oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,1 bis 99,5, vorzugsweise von etwa 0,5 bis 95 Gew.-% der Gesamtmischung, vorhanden sein.

Die oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen können außer den erfindungsgemäßen Wirkstoffen auch weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

Die Herstellung der oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen erfolgt in üblicher Weise nach bekannten Methoden, z.B. durch Mischen des oder der Wirkstoffe mit dem oder den Trägerstoffen.

Die Wirkstoffe oder die pharmazeutischen Zubereitungen können lokal, oral, parenteral, intraperitoneal und/oder rectal, vorzugsweise parenteral, appliziert werden.

Im allgemeinen ist es in der Humanmedizin als vorteilhaft anzusehen, den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe in Gesamtmengen von etwa 5 bis 500, vorzugsweise 50 bis 250 mg je 24 Stunden, gegebenenfalls in Form mehrerer Einzelgaben zur Erzielung der gewünschten Ergebnisse, zu verabreichen. Eine Einzelgabe enthält den oder die erfindungsgemäßen Wirkstoffe, vorzugsweise in Mengen von etwa 10 bis etwa 300, insbesondere 50 bis 200 mg/Dosis. Es kann jedoch erforderlich sein, von den genannten Dosierungen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit von der Art und dem Körpergewicht des zu behandelnden Objekts, der Art und der Schwere der Erkrankung, der Art der Zubereitung und der Applikation des Arzneimittels sowie dem Zeitraum bzw. Intervall, innerhalb welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend

-20-

sein, mit weniger als der obengenannten Menge Wirkstoff auszukommen, während in anderen Fällen die oben angeführte Wirkstoffmenge überschritten werden muß.

Die Festlegung der jeweils erforderlichen optimalen Dosierung und Applikationsart der Wirkstoffe kann durch jeden Fachmann aufgrund seines Fachwissens leicht erfolgen.



- 21 -

Ansprüche

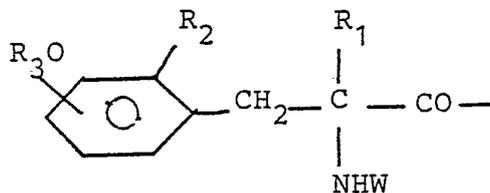
1. Pharmakologisch aktive Peptide der Formel:
Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C.....
wobei Tyr gleich der Aminosäure Tyrosin und
Pro gleich der Aminosäure Prolin ist. A, B, C...
kann jede beliebige Aminosäure sein (der stereo-
chemischen L-Form). X kann jede beliebige Amino-
säure der D-Form sein.
2. Pharmakologisch aktive Peptide nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide die folgen-
den Formeln aufweisen:
Tyr¹-X-A
Tyr¹-X-A-Pro
Tyr¹-X-A-Pro-B
Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro
Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C
Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C-Pro
Tyr¹-X-A-Pro-B-Pro-C-Pro-D.....
A, B, C, D... kann jede beliebige L-Aminosäure sein,
auch Prolin und Tyrosin. X kann jede beliebige D-Amino-
säure sein.
3. Pharmakologisch aktive Peptide nach einem der Ansprüche
1 - 2, dadurch gekennzeichnet, daß
X D-Prolin
A L-Phenylalanin
B L-Glycin
C L-Isoleucin
D L-Asparagin
ist.

-22-

4. Pharmakologisch aktive Peptide nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß X gleich D-Alanin, D-Threonin oder D-Valin ist.

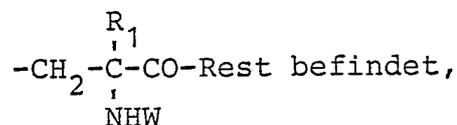
5. Pharmakologisch aktive Peptide nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß

a) das endständige L-Tyrosin der allgemeinen Formel:



vorliegt, wobei im einzelnen bedeuten:

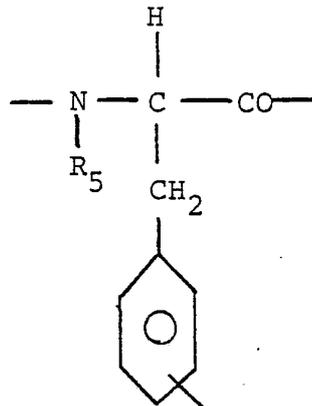
- R_1 für Wasserstoff oder eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen,
 R_2 für Wasserstoff oder zusammen mit R_1 für eine Aethylenbrücke,
 R_3 für Wasserstoff, eine Alkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen oder eine R_4CO -Gruppe,
 R_4 für einen gesättigten oder ungesättigten, geradkettigen oder verzweigten Alkylrest mit 1 bis 17 C-Atomen, einen Phenylrest oder einen Phenylalkylrest mit 7 bis 12 C-Atomen, wobei die Phenylreste durch 1 oder 2 Substituenten aus der Reihe Halogen, Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen oder Alkoxy mit 1 bis 4 C-Atomen substituiert sein können, wobei die R_3O -Gruppe sich in meta- oder para-Stellung zum



-23-

W für Wasserstoff, Alkyl mit 1 bis 5 C-Atomen, Alkenyl mit 3 bis 5 C-Atomen, Cyclopropylmethyl, Cyclobutylmethyl, R_4CO- , H-Arg-, H-Lys-, H-Phe- oder H-Tyr,

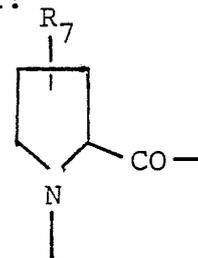
b) das L-Phenylalanin der allgemeinen Formel vorliegt:



wobei im einzelnen bedeuten: $(R_6)_Z$

R_5 für Wasserstoff oder Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen,
 R_6 für Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Nitro,
 Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen oder Alkoxy mit 1 bis
 4 C-Atomen, für 1 oder 2

c) das L-Prolin (an den Positionen der Aminosäure 4, 6, 8.. des Peptids) der allgemeinen Formel:



vorliegt, wobei im einzelnen

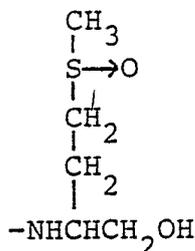
- R_7 für Wasserstoff, eine Hydroxygruppe, eine Alkyl- oder Alkoxygruppe mit 1 bis 4 C-Atomen steht,
- am Stickstoff eine Alkyl- oder Alkoxygruppe mit 1 bis 4 C-Atomen gebunden ist,
- eine oder mehrere Ketogruppen in den Ring eingeführt sind,

-24-

d) die endständige, C-terminale Aminosäure als Amid oder Ester vorliegt.

(Die C-terminale Aminosäure liegt in der Peptidkette rechts von Tyr.)

6. Pharmakologisch aktive Peptide nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß die C-terminale Aminosäure eines ungeradzahligen Peptids Methionin ist.
7. Pharmakologisch aktive Peptide nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß diese Penta-, Hepta- oder Nonapeptide sind.
8. Pharmakologisch aktive Peptide nach einem der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß das endständige Methionin als -Met(O)-OH der Formel:



vorliegt.

9. Pharmakologisch aktive Peptide nach einem der Ansprüche 1 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß diese mit einem in der Peptidchemie üblichen Verfahren synthetisiert werden.
10. Pharmakologisch aktive Peptide nach einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Knüpfen der Peptidbindung zwischen den einzelnen Aminosäuren und/oder den kleineren Peptidfragmenten mit den üblichen Methoden erfolgt.



-25-

11. Arzneimittel und Tierarzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß diese die in Anspruch 1 - 10 charakterisierten, pharmakologisch aktiven Peptide und/oder deren Derivate und/oder deren Säureadditionssalze und/oder deren Metallkomplexe enthalten.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 80/00126

I. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ³		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder sowohl nach der nationalen Klassifikation als auch nach der IPC Int.Cl. ³ : C 07 C 103/52; A 61 K 37/02		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁴		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl. ³	C 07 C 103/52; A 61 K 37/02	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁵		
III. ALS BEDEUTSAM ANZUSEHENDE VERÖFFENTLICHUNGEN ¹⁴		
Art +	Kennzeichnung der Veröffentlichung, ¹⁶ mit Angabe, soweit erforderlich, der in Betracht kommenden Teile ¹⁷	Betr. Anspruch Nr. 18
P	Unlisted Drugs, Februar 1980, Edition Spec.Library Association (US) R.Naunym Schmied Arch Pharmacol 308 (Suppl): R 39 Casomorphins, siehe das ganze Artikel	1,2,3,4
--		
P	Unlisted Drugs, Oktober 1980, Edition Spec.Library Association (US) R.Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 311 (Suppl): β CasM-4 siehe das ganze Artikel	1,2,3,4

+ Besonders Arten von angegebenen Veröffentlichungen: ¹⁵		
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert	"P" Veröffentlichung, die vor dem Anmeldedatum, aber am oder nach dem beanspruchten Prioritätsdatum erschienen ist	
"E" frühere Veröffentlichung, die erst am oder nach dem Anmeldedatum erschienen ist	"T" Spätere Veröffentlichung die am oder nach dem Anmeldedatum erschienen ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben wurde	
"L" Veröffentlichung, die aus anderen als den bei den übrigen Arten genannten Gründen angegeben ist	"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung	
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des tatsächlichen Abschlusses der internationalen Recherche ²	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts ²	
10. Dezember 1980	19. Dezember 1980	
Internationale Recherchenbehörde ¹ EUROPÄISCHES PATENTAMT	Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten ²⁰ G. L. M. KRUYDENBERG	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/DE 80/00126

International Application No

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ³				
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC				
Int. Cl. ³ : C 07 C 103/52; A 61 K 37/02				
II. FIELDS SEARCHED				
Minimum Documentation Searched ⁴				
Classification System	Classification Symbols			
Int. Cl. ³	C 07 C 103/52; A 61 K 37/02			
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵				
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴				
Category *	Citation of Document, ¹⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸		
P	Unlisted Drugs, February 1980, Edition Spec. Library Association (US) R. Naunyn Schmied Arch Pharmacol 308 (Suppl): R 39 Casomorphins, see the whole article	1, 2, 3, 4		
P	Unlisted Drugs, October 1980, Edition Spec. Library Association (US) R. Naunyn - Schmiedeberg's Arch Pharmacol 311 (Suppl): ⁴ CasM - 4 see the whole article	1, 2, 3, 4		
<p>* Special categories of cited documents: ¹⁵</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"A" document defining the general state of the art</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document cited for special reason other than those referred to in the other categories</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> </td> <td style="width: 50%; border: none;"> <p>"P" document published prior to the international filing date but on or after the priority date claimed</p> <p>"T" later document published on or after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance</p> </td> </tr> </table>			<p>"A" document defining the general state of the art</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document cited for special reason other than those referred to in the other categories</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p>	<p>"P" document published prior to the international filing date but on or after the priority date claimed</p> <p>"T" later document published on or after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance</p>
<p>"A" document defining the general state of the art</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document cited for special reason other than those referred to in the other categories</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p>	<p>"P" document published prior to the international filing date but on or after the priority date claimed</p> <p>"T" later document published on or after the international filing date or priority date and not in conflict with the application, but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance</p>			
IV. CERTIFICATION				
Date of the Actual Completion of the International Search ²		Date of Mailing of this International Search Report ³		
10 December 1980 (10.12.80)		19 December 1980 (19.12.80)		
International Searching Authority ¹		Signature of Authorized Officer ²⁰		
European Patent Office				