



CH 676 425 A5



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① **CH 676 425 A5**

⑤ Int. Cl.⁵: **A 61 K 37/02**

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

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑰ Gesuchsnummer: 1445/88	⑦ Inhaber: Board of Regents of the University of Texas System, Austin/TX (US)
⑳ Anmeldungsdatum: 07.08.1987	⑧ Erfinder: Lipton, James M., Dallas/TX (US)
⑳ Priorität(en): 08.08.1986 US 894910 23.07.1987 US 076625	⑨ Vertreter: Bovard AG, Bern 25
㉔ Patent erteilt: 31.01.1991	⑩ Internationale Anmeldung: PCT/US 87/01994 (En)
④ Patentschrift veröffentlicht: 31.01.1991	⑪ Internationale Veröffentlichung: WO 88/00833 (En) 11.02.1988

⑤ Verwendung von Peptiden zur Herstellung von entzündungshemmenden Mitteln.

⑥ Es werden von α -MSH verschiedene Peptide mit 3 bis 13 Aminosäuren und einer α -MSH entsprechenden Sequenz, welche die Tripeptid-Sequenz Lys-Pro-Val enthalten und biologisch funktionelle Aequivalente zur Herstellung von entzündungshemmenden Medikamenten verwendet. Die erhaltenen Medikamente stellen eine Alternative zu entzündungshemmenden Mitteln auf Salicylat- und Steroidbasis dar.

Beschreibung

Diese Erfindung bezieht sich auf die Verwendung eines von α -MSH verschiedenen Peptides mit 3–13 Aminosäuren und einer α -MSH entsprechenden Sequenz, welches die Tripeptid-Sequenz Lys-Pro-Val enthält, das im alpha-melanocyten-stimulierenden Hormon und ACTH enthalten ist und von biologischen Äquivalenten davon zur Herstellung eines entzündungshemmenden Medikamentes.

Es gibt zwei Klassen von Mitteln, welche gegenwärtig als antipyretische Mittel eingesetzt werden, die Salicylate und die Para-Aminophenol-Derivate. Die Salicylate, repräsentiert durch Acetylsalicylsäure (d.h. Aspirin), sind die meistverwendeten antipyretischen Mittel. Aspirin ist der Prototyp sowohl für die Salicylate, als auch für andere Medikamente mit ähnlichen Wirkungen und stellt den Referenzstandard für den Vergleich und die wissenschaftliche Auswertung dieser Mittel dar. Der antipyretische Effekt von Aspirin ist im allgemeinen bei Patienten mit Fieber schnell und wirkungsvoll. Die Salicylate bewirken, dass der «Thermostat» auf Normaltemperatur zurückgesetzt wird. Obschon Aspirin im allgemeinen für die meisten Individuen gut verträglich ist, sind mit dessen Verwendung eine Anzahl von toxischen Nebenwirkungen verbunden. Von besonderer Bedeutung sind die salicylat-induzierte Geschwürsbildung und manchmal Blutungen. Die Verschlimmerung von peptischen Ulcersymptomen (Sodbrennen, Dyspepsie) von gastro-intestinalen Blutungen und erosiver Gastritis wurde von aspirin-einnehmenden Patienten geschildert. Andere weniger übliche Nebenwirkungen sind Tinnitus und Hörverlust, Veränderungen beim Säure-Basen-Gleichgewicht und beim Elektrolytmuster und Atemalkalose. Obschon solche Nebenwirkungen im allgemeinen nicht besonders gefährlich sind, neigen sie dazu, die Compliance des Patienten zu reduzieren. Andere Salicylat-Derivate, welche im allgemeinen wegen ihrer analgetischen oder entzündungshemmenden Aktivität verwendet werden, zeigen bezüglich dem Aspirin erhöhte Toxizitäten.

Die Para-Aminophenol-Derivate, Acetaminophen und Phenacetin sind Aspirin-Alternativen zum analgetischen und antipyretischen Gebrauch. Acetaminophen hat eine etwas kleinere Gesamtoxität und wird im allgemeinen gegenüber Phenacetin bevorzugt. Da Acetaminophen gut verträglich und ihm viele der unerwünschten Nebeneffekte von Aspirin fehlen, wurde es zum bevorzugten «gewöhnlichen Haushalt-Analgetikum» ernannt. Die Zweckmässigkeit für diesen Einsatz ist jedoch fragwürdig: bei akuten Überdosierungen kann Acetaminophen fatale, hepatitische Nekrose verursachen. Zusätzlich kann Phenacetin Methemoglobinämie und hemolytische Anämie als Form einer akuten Toxizität verursachen, dies ist jedoch gewöhnlich die Konsequenz einer chronischen Überdosierung. Bei der Behandlung von Pyrexie sind diese Mittel ungefähr gleich wirksam, wie Aspirin.

Kürzliche Fortschritte beim Studium des alpha-melanocytenstimulierenden Hormons (nachstehend als «MSH» bezeichnet) haben gezeigt, dass dieses Protein bei der Behandlung von Pyrexie aktiv ist. Alpha-MSH ist ein 13-Aminosäuren-Peptid, das vom adrenocorticotropischen Hormon («ACTH») abgeleitet ist. Sowohl MSH, als auch ACTH teilen eine 13-Aminosäuren-Sequenz, welche wirksam ist, indem sie die Körpertemperatur mässigt. Es ist bewiesen, dass diese Neuropeptide zentral vermittelte Verfahren steuern können, einschliesslich der zentralen Steuerung der Körpertemperatur. Beide Peptide setzen die Kerntemperatur von fieberfreien Kaninchen bei peripherer oder zentraler Verabreichung in genügenden Dosen herab. Viel kleinere Dosen reduzieren das Fieber ohne Änderung der normalen Temperatur.

Alpha-MSH wird in Gehirnregionen gefunden, welche die Temperaturregulierung steuern, einschliesslich dem vorderen Hypothalamus und dem Septum. Die Konzentration von Alpha-MSH im Septum wird bei Fieberzuständen erhöht und die Konzentration im bogenförmigen Nucleus neigt gleichzeitig zur Absenkung. Vergleichende Studien der antipyretischen Aktivität von zentral verabreichtem Alpha-MSH mit dem weitverbreiteten Antipyretikum Acetaminophen zeigt, dass Alpha-MSH bei der Fiebersenkung sehr viel wirksamer ist als Acetaminophen und das Alpha-MSH gewichtsmässig mehr als 2500 Mal wirksamer für die Reduzierung des Fiebers ist als Acetaminophen. Es sind keine von ACTH verschiedene endogene Substanzen bekannt, welche eine solche Potenz für die Fieberreduktion besitzen.

Die antipyretische Potenz von Alpha-MSH und die Tatsache, dass dieses Peptid das Fieber sogar bei peripherer Verabreichung reduziert, kann eine klinische Bedeutung haben. ACTH wurde zur Reduzierung des klinischen und experimentellen Fiebers verwendet, sobald es erstmals beschrieben war, jedoch stimuliert dieses Peptid die Corticosteroid-Freisetzung und kann bei wiederholter Verabreichung zum Cushing-Syndrom führen. Andererseits stimuliert das kürzere Alpha-MSH-Molekül, welches vom ACTH abgeleitet ist, die Steroid-Freisetzung nicht und es scheint, dass keine irreversiblen, schädlichen Wirkungen bestehen, wenn es Kaninchen oder Menschen verabreicht wird. Im Hinblick auf ACTH (Aminosäuren 1 bis 39 von Propiocortin) war schon früher bekannt, dass wegen seinem corticosteroid-stimulierenden Effektes dieses Protein aktiv bei der Behandlung von Entzündungen war. Die kürzeren ACTH-verwandten Peptide, wie Alpha-MSH (Aminosäuren 1 bis 13 von ACTH), welche keine corticotrope Aktivität besitzen, wurde keine anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben, und es bestand bisher kein Grund, eine solche Rolle für Peptide vorzuschlagen, welche den aminoterminalen Teilen von ACTH entsprechen und darüberhinaus keine corticotrope Aktivität besitzen. Die vorliegende Erfindung betrifft die im Anspruch 1 definierte Verwendung.

Der Wirkstoff der erhaltenen pharmazeutischen Zusammensetzung ist ein von α -MSH verschiedenes Peptid mit 3–13 Aminosäuren, das eine Aminosäure-Sequenz umfasst, die der Sequenz von α -MSH

entspricht und die Tripeptid-Sequenz enthält, die den Aminosäuren 11 bis 13 von Alpha-MSH, Lysin-Prolin-Valin («Lys-Pro-Val») entspricht oder ein biologisches Äquivalent davon, das ähnliche hydropathische Indizes aufweist. In besonderen Ausführungsformen ist die Erfindung auf die Verwendung des Tripeptids selbst gerichtet.

5 Vorzugsweise wird das Tripeptid zur Erzielung von maximalen Heilwirkungen verabreicht, vorzugsweise in einer biologisch «geschützten» Form. Wenn das Tripeptid durch Acylierung des Amino-Terminus und/oder Amidierung des Carboxy-Terminus «geschützt» ist, zeigt das resultierende Tripeptid eine Zunahme in seiner pharmakologischen Aktivität. Ähnlich zeigt das «geschützte» oder «ungeschützte» Tripeptid im weiteren eine Zunahme der antipyretischen Aktivität.

10 Das hergestellte Medikament kann für die Behandlung einer Entzündung eines Individuums, welches eine solche Behandlung nötig hat, verwendet werden, dabei wird eine wirksame Dosis eines Peptides, welches die Tripeptid-Sequenz umfasst, verabreicht. Überdies können solche Peptide bei der Behandlung von sowohl allgemeinen, wie auch lokalisierten Entzündungen verwendet werden und sind demzufolge nützlich als Alternative zu entzündungshemmenden Mitteln auf Basis von steroiden und Salicylaten. Die entzündungshemmende Aktivität wird im Anschluss an eine Verabreichung des Tripeptides an Tiere beobachtet, bei Dosen, die etwa gleich oder grösser als diejenigen sind, welche eine Fiebersenkung bewirken und wobei die Reaktivität der behandelten Tiere und der Kontrolltiere auf die Entzündungsherausforderung getestet wird.

Die entzündungshemmenden Medikamente enthalten ähnliche Dosen des Tripeptides, wie sie beispielsweise für die Reduktion von Schwellungen im Zusammenhang mit Entzündungen und/oder Kapillarpermeabilität für Hydrocortison, einem akzeptierten Standard für die entzündungshemmende Aktivität angewandt werden. Der empfindliche «Haut-Bläuungs»-Versuch wurde verwendet, um die Fähigkeit des Tripeptides zu testen, die kapillarpermeabilisierenden Effekte von Entzündungsmitteln, wie Histamin, zu hemmen. In diesem Test zeigte das geschützte Lys-Pro-Val-Tripeptid Anti-Histamin-Effekte und insbesondere eine Reduktion in der histamin-vermittelten Zunahme der Kapillarpermeabilität, bei intravenösen Dosierungen von nur 1,25 µg geschütztem Tripeptid/kg Körpergewicht. Überdies zeigte das intraperitoneal verabreichte Tripeptid im traditionellen Carrageenan-Rattenpfotenödem-Test die Fähigkeit, Carrageenan-induzierte Schwellungen an Rattenpfoten zu reduzieren, auf Gewichtsbasis im Verhältnis mit Hydrocortison. Aus solchen Beobachtungen kann demzufolge geschlossen werden, dass das Tripeptid Lys-Pro-Val ein wirksames, entzündungshemmendes Mittel ist, wenn es einem Patienten in einer Dosis von nur 1 bis 10 µg/kg und vorzugsweise in der Grössenordnung von etwa 0,2 bis 3 mg/kg/Tag verabreicht wird.

Fig. 1 Aminosäure-Sequenz von Alpha-MSH
35 Fig. 2 Vergleich der Hemmung einer durch Ac-Lys-Pro-Val-NH₂ (100 mg/kg) und Hydrocortison (100 mg/kg) bei Ratten verursachte Pfortenschwellung. Jeder Wert ist ein prozentualer Mittelwert der Änderung des Pfortenvolumens bezüglich der Änderung beim passenden Kontrollpfortenvolumen.

Die Peptide, welche bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden, umfassen die Sequenz Lysin-Prolin-Valin. Diese Tripeptid-Sequenz wird folgendermassen gekennzeichnet.

In seiner natürlich vorkommenden Form enthält die Tripeptid-Sequenz (Lysin-Prolin-Valin) die Aminosäure-Nummern 11 bis 13 des alpha-melanocyten-stimulierenden Hormons (nachstehend als «MSH» bezeichnet) und von ACTH. Diese Erkenntnis kann die antipyretische Aktivität des amino-terminalen Teils von ACTH (Aminosäure-Nummern 1 bis 24 von Proopiocortin) und MSH (Aminosäure-Nummern 1 bis 13 von ACTH und Proopiocortin erklären; vergleiche Fig. 1), beide zeigen die Tripeptid-Sequenz innerhalb ihrer Struktur. Demzufolge sind sowohl MSH als auch ACTH potentielle, natürliche Quellen aus welchen das antipyretische Tripeptid erhalten werden kann.

Wegen dem hohen corticotropischen Effekt von ACTH, welcher zu Cushing-Syndrom-Vorfällen führen kann, werden erfindungsgemäss Peptide der Alpha-MSH-Sequenz verwendet, wobei diese Peptide mindestens die Lys-Pro-Val-Sequenz umfassen. Dies basiert auf der Erkenntnis, dass Alpha-MSH (Aminosäuren 1 bis 13 von ACTH) den corticotropen Effekt von ACTH nicht ausübt und dagegen die entzündungshemmende Wirkung direkt auszuüben scheint, anstelle über ein Corticosteroid-Zwischenprodukt.

Vorzugsweise kann das Tripeptid aus MSH isoliert werden. Dies kann durch eine erste Fragmentierung des MSH-Proteins in vier kleinere Peptide durchgeführt werden, indem mit dem proteolytischen Enzym Chymotrypsin eine vollständige Verdauung durchgeführt wird. Die Papierelektrophorese der Verdauungsprodukte zeigt vier Hauptprodukte, wovon eines das Tetrapeptid Glycin-Lysin-Prolin-Valin ist, das direkt verändert werden kann. Der Glycinrest kann jedoch durch partielle Säurehydrolyse entfernt werden, wobei das Tripeptid erhalten wird.

Die erfindungsgemäss verwendeten Peptide können ebenfalls durch chemische Synthese erhalten werden. Diese wird durch Bildung von Peptidbindungen zwischen den zweckmässigen Aminosäuren durchgeführt. Aminosäuren sind amphotere Moleküle, welche sowohl einen Säurerest (-COOH) und einen schwach-basischen Rest (-NH₂) aufweisen. Die Bildung der Peptidbindung (-CONH) wird demzufolge durch einen nukleophilen Angriff auf die Aminogruppe auf die Carbonsäure-Funktion durchgeführt.

65 Bei der Bildung von Peptidbindungen zwischen zwei hypothetischen Aminosäuren X und Y, können vier

mögliche Dipeptide hergestellt werden: X-Y, Y-X und X-X. Um demzufolge die sich in einer solchen Wechselwirkung bildenden Strukturen zu reduzieren, muss der Amino- oder Carboxy-Terminus der zweckmässigen Aminosäure zuerst «geschützt» werden, damit eine Reaktion, welche den «geschützten» Rest involviert, ausgeschlossen bleibt. Wenn beispielsweise «c» einen geschützten Carboxy-Terminus darstellt und «n» einen geschützten Amino-Terminus, dann könnte eine Wechselwirkung, welche cX und Yn umfasst, nur eine Struktur cX-Yn bilden.

Um jedoch für synthetische Zwecke chemisch nützlich zu sein, müssen die Schutzgruppen entfernbar sein. Im allgemeinen können die Carboxygruppen durch Veresterung oder Amidierung der -COOH zu -COO-Alkyl oder -CONH₂ geschützt werden. Die bevorzugten Alkylgruppen für den Carboxyterminus umfassen Methyl- und Benzylreste, es können jedoch auch andere Alkylgruppen, wie Ethyl-, Propyl-, Butyl-, p-Nitrobenzyl- oder p-Methoxybenzylgruppen verwendet werden.

Gewünschtemfalls wird der Amino-Terminus durch Acylierung geschützt, indem eine Carboxygruppe, wie eine Acetylgruppe, t-Butoxycarbonylgruppe, p-Amyloxycarbonylgruppe, o-Nitrophenylsulfenylgruppe, Benzoyloxycarbonylgruppe, p-Nitrobenzoyloxycarbonylgruppe, Tosyl- oder Formylgruppe eingeführt wird.

Die Schutzgruppen können ebenfalls einer Funktion in der Natur dienen. Bioaktive Peptide, die eine Acetylgruppe enthalten, die an den Amino-Terminus des Peptides gebunden ist und eine Aminofunktion enthalten, die an den Carboxy-Terminus gebunden ist, sind weniger empfindlich auf Säurehydrolyse. Im weiteren ist spekuliert worden, dass solche Gruppen eine Rolle bei der Reduktion der Empfindlichkeit der «geschützten» Peptide gegen enzymatische Angriffe und Zersetzung spielen. Demzufolge ist ein «geschütztes» Tripeptid synthetisiert worden, welches diese Schutzgruppen enthält. Dieses geschützte Tripeptid ist pharmakologisch aktiver als das ungeschützte Tripeptid.

Die entzündungshemmende Wirkung des Tripeptides wird unter Verwendung von anerkannten in vivo-Tests demonstriert, welche entwickelt wurden, um die Fähigkeit eines Testmittels die unterschiedliche Symptomologie von Entzündungen einschliesslich von Gewebeschwellungen (z.B. lokale Ödeme) und kapillare Permeabilität zu hemmen.

In einem Test, dem Haut-Bläuungs-Test, wurde das Tripeptid auf seine Fähigkeit getestet, die kapillardurchdringenden Effekte des Histamins durch seine Wirkung bei der Blockierung der Effekte von exogenem Histamin zu hemmen. Unter Verwendung dieses Tests, von welchem die Erfinder herausgefunden haben, dass er auf kleine Wirkstoffmengen empfindlich ist, wurde gefunden, dass Dosierungen von nur etwa 1 Mikrogramm des geschützten Tripeptides pro kg nachweisbare Wirkungen ausübten, wie dies durch die Reduktion der Histamin-vermittelten Zunahme der vaskulären Permeabilität für vitale Farbstoffe gemessen wurde.

In einem zweiten Test, welcher im Fachgebiet als Carrageenan-Rattenpfoten-Ödemtest genannt wird, zeigte das Tripeptid eine entzündungshemmende Wirkung, die grob gesehen, äquivalent zu derjenigen des wohlbekanntesten entzündungshemmenden Mittels Hydrocortison ist. In diesem Test wurden den Ratten zuerst intraperitoneale Dosen Kontrollösung (Kochsalzlösung), Tripeptid oder Hydrocortison verabreicht. Die Pfoten der Ratten wurden dann mit einer antigenischen Substanz herausgefordert, im allgemeinen mit Carrageenan und die resultierende Schwellung wurde gemessen und die Daten verglichen. Bei solchen Tests wurde gefunden, dass ungefähr gleiche Gewichte des geschützten Tripeptides (Diacetyl-Lys-Pro-Val-NH₂) und Hydrocortison grob äquivalente Gesamtreaktionen zur Reduktion des Carrageenan-induzierten Schwellungsgrades zeigten.

Auf Basis der hervorgehenden und zusätzlichen Beobachtungen wurde gefunden, dass Dosen in der Grössenordnung von 0,2 bis etwa 3 mg geschütztem Tripeptid pro kg Körpergewicht pro Tag vorteilhafte Wirkungen zeigen bezüglich der entzündungshemmenden Wirkung. Im allgemeinen werden Dosen in der Grössenordnung von 0,35 bis etwa 1,5 mg von geschütztem Tripeptid/kg Körpergewicht/Tag verabreicht, um den grössten entzündungshemmenden Heilungsgrad zu erzielen. Diese Dosisbereiche wurden von der oben erwähnten Beobachtung der ungefähren Äquipotenz des Tripeptides und Hydrocortison und vom allgemeinen Fachwissen bezüglich der effektiven Dosisbereiche für Hydrocortison abgeleitet (siehe z.B. Goodman et al. (1985), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Edition).

Das Tripeptid wird im allgemeinen parenteral verabreicht, z.B. intramuskulär oder intravenös. Wegen seiner kleinen Grösse der Membranpermeabilität und der verhältnismässig säurestabilen Struktur, erkennt man, dass das Tripeptid ungeachtet der etwas höheren Dosen oral verabreicht werden kann. In diesem Hinblick wird angenommen, dass Dosen in der Grössenordnung von etwa 0,2 bis etwa 3,5 mg/kg/Tag Heilwirkungen erzielt werden.

Pharmazeutische Zusammensetzungen des bevorzugten Tripeptides, vorzugsweise eines geschützten Tripeptides, wie Diacetyl-Lys-Pro-Val-NH₂, umfassen im allgemeinen den Wirkstoff in Kombination mit pharmazeutisch annehmbaren Puffern, Verdünnungsmitteln, Stabilisatoren und dergleichen. Für eine ziemlich vollständige Auflistung von verschiedenen Techniken, einschliesslich einer Vielzahl von Mitteln und Additiven, die für die Herstellung von annehmbaren pharmazeutischen Zusammensetzungen nützlich sind, kann Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition, 1980, Mack Publishing Co., beigezogen werden.

In einer bevorzugten pharmazeutischen Zusammensetzung werden ungefähr 100 bis 500 mg Diacetyl-Lys-Pro-Val-NH₂ in etwa 1 bis 7 cc. steriler, isotonischer Kochsalzlösung dispergiert, einschliesslich eines pharmazeutisch annehmbaren Puffers, um einen etwa neutralen pH-Wert aufrechtzuerhalten. Für

die intravenöse Verabreichung, beispielsweise für einen Patienten, der unter Arthritis oder einer ernsthaften allergischen Reaktion oder an verschiedenen anderen Leiden, die mit Entzündungen verbunden sind, leidet, wird im allgemeinen vorzugsweise etwa 0,2 bis 3,5 mg/kg/Tag des Mittels durch langsame Infusion während einer Zeitdauer (bis zu einigen Stunden) verabreicht. Falls die Infusion unpraktisch ist, wird das Mittel in Form einer intramuskulären Injektion verabreicht, vorzugsweise in Kombination mit einem lipophilen Träger und etwas höheren Dosen. Für die Behandlung von milden bis schweren arthritischen Episoden, wird im allgemeinen empfohlen, dass eine parenterale Dosis in der Grössenordnung von etwa 0,3 bis 1,5 mg/kg/Tag, vorzugsweise etwa 0,5 bis etwa 0,6 mg/kg/Tag verabreicht wird. Für ernsthafte allergische Reaktionen jedoch können höhere Dosen in der Grössenordnung von etwa 2,5 bis etwa 4 mg/kg/Tag angegeben werden. Es wird angenommen, dass viele Änderungen in der Aminosäure-Sequenz der erfindungsgemäss zu verwendenden Peptide vorgenommen werden können und immer noch ein Protein erhalten wird, welches eine biologisch funktionell äquivalente pharmakologische Aktivität ausübt. Beispielsweise wurde durch Kyte et al. (1982), J. Mol. Biol., 157:105 gefunden, dass gewisse Aminosäuren durch andere Aminosäuren, welche einen ähnlichen hydropathischen Index aufweisen, ersetzt werden können und die biologische Aktivität des Proteins erhalten bleibt. Wie in der nachstehenden Tabelle gezeigt, wird den Aminosäuren ein hydropathischer Index auf Basis ihrer Hydrophobizität und ihrer Ladungscharakteristiken zugeschrieben. Es wird angenommen, dass der relative, hydropathische Charakter der Aminosäure die Sekundärstruktur des resultierenden Proteins bestimmt, welches schliesslich die Wechselwirkung des Proteins mit seinem Rezeptor bestimmt.

Biologisch funktionelle Äquivalente der erfindungsgemäss verwendeten Peptide werden erhalten, indem Aminosäuren durch solche mit ähnlichen hydropathischen Werten ersetzt werden. In der vorliegenden Beschreibung wird ein biologisch funktionelles Äquivalent als ein solches Protein definiert, welches bezüglich der biologischen Aktivität funktionell äquivalent ist. Somit haben beispielsweise Isoleucin oder Leucin einen hydropathischen Index von +4,5 bzw. +3,8 und können durch Valin (+4,2) ersetzt werden und es wird immer noch ein Protein mit der gleichen biologischen Aktivität erhalten. Alternativ kann am anderen Ende der Skala Lysin (-3,9) durch Arginin (-4,5) ersetzt werden usw. Im allgemeinen wird angenommen, dass Aminosäuren erfolgreich substituiert werden können, wo eine solche Aminosäure einen hydropathischen Wert von innerhalb etwa +/- einer hydropathischen Indexeinheit der ersetzten Aminosäure aufweist.

30

Aminosäure	Hydropathischer Index
Isoleucin	4,5
Valin	4,2
Leucin	3,8
Phenylalanin	2,8
Cystein/Cystin	2,5
Methionin	1,9
Alanin	1,8
Glycin	-0,4
Threonin	-0,7
Tryptophan	-0,9
Serin	-0,8
Tyrosin	-1,3
Prolin	-1,6
Histidin	-3,2
Glutaminsäure	-3,5
Glutamin	-3,5
Asparginsäure	-3,5
Asparagin	-3,5
Lysin	-3,9
Arginin	-4,5

60

Die folgenden Beispiele erläutern die durch die Erfinder durchgeführten Experimente im Zusammenhang mit der Herstellung des bevorzugten Tripeptides und ebenso von verschiedenen «geschützten» Arten und die Verwendung des Tripeptides in verschiedenen anerkannten in vivo-Tests, welches seine

65

Aktivität demonstrieren. Es wird darauf hingewiesen, dass diese Beispiele nur zur Erläuterung dienen und Änderungen in diesem Lichte und im Lichte von Fachkenntnissen durchgeführt werden können. Wenn demnach beispielsweise Peptide verschiedene Sequenzen besitzen oder eine längere oder kürzere peptidische Länge gewünscht wird, ist es für den Fachmann naheliegend, dass die nachstehend dargelegten Verfahren verwendet werden können. Wenn demzufolge die Sequenz Arg-Pro-Val gewünscht ist (ein biologisch funktionelles Äquivalent von Lys-Pro-Val) ist es offensichtlich, dass Dibenzylloxycarbonyl-konjugiertes Arginin («Z-Arg») anstelle von «Z-Arg» verwendet werden sollte. Wenn überdies beispielsweise Gly-Lys-Pro-Val gewünscht ist, ist es offensichtlich, dass «Z-Gly» als Startreagens verwendet werden sollte und solche synthetischen Schritte verwendet werden sollten, wie sie für die sequentielle Addition der Lys-, Pro- bzw. Val-Reste dargelegt sind. Diese und andere Änderungen zur Herstellung von verschiedenen Peptiden sind wohlbekannt und für den Fachmann naheliegend.

Beispiel I:

15 Chemische Synthese von L-Lysin-L-Prolin-L-Valin

Das Tripeptid wurde in üblicher Weise durch Bachem, Inc. Torrance, CA, folgendermassen synthetisiert:

20 1. Z-Lys-Pro-OMe-Herstellung

50 mmoles (20,7 g) Dibenzylloxycarbonyl-konjugiertes Lysin («Z-Lys») in 200 ml Methylenchlorid wurde mit 50 mmoles (8,3 g) Prolinmethylester (Pro-OMe) in 100 ml Dimethylformamid vereinigt. Die Mischung wurde in eine konische Flasche gefüllt und auf -5°C unter Rühren abgekühlt. 50 mmoles (5,5 ml) N-Methylmorpholin wurde zugegeben und anschliessend wurden 10,3 g Dicyclohexyl-carbodiimid in 20 ml Methylenchlorid beigelegt und die Reaktionsmischung wurde über Nacht gerührt. Die Mischung wurde dann vom Harnstoff abfiltriert und das Filtrat wurde im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit Natriumbicarbonatlösung, Wasser, 1N Salzsäure und Wasser gewaschen. Das Ethylacetat wurde im Vakuum entfernt und das ölige Produkt wurde ohne weitere Reinigung verseift.

2. Entfernung der -OMe-Carboxy-Terminus-«Schutz»-Gruppe

Das ölige Produkt aus dem vorhergehenden Versuch wurde in Methanol (200 ml) aufgelöst und mit 2N Natriumhydroxid (25 ml) während 1 Std. behandelt. Das Methanol wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit 6N Salzsäure angesäuert. Das Produkt wurde mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Ethylacetat wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand wurde mit Hexan trituriert. Das Produkt wurde durch Dünnschicht-Chromatographie unter Verwendung von Chloroform: Methanol: Essigsäure (95:4:1) geprüft.

3. Herstellung von Z-Lys-Pro-Val-OBe

Die nächste Synthesestufe des Tripeptides umfasste die Zugabe eines carboxy-geschützten Valin-Restes (Val-OBe). Die Schutzgruppe war in diesem Fall ein Benzylester.

37 mmoles (19 g) Z-Lys-Pro, erhalten gemäss der obigen Stufe 2, wurde in 200 ml destilliertem Tetrahydrofuran aufgelöst. Diese Lösung und 4,1 ml N-Methylmorpholin wurden zusammen gemischt und auf -15°C unter Rühren abgekühlt. Isobutylchloroformiat (5 ml) wurde zur Mischung gegeben und während 5 Min. bei -10°C gerührt. In Konkurrenz dazu wurden 35 mmoles (13,2 g) Valin-benzylester-tosylat in 100 ml Dimethylformamid aufgelöst. Die Mischung wurde auf -10°C abgekühlt und mit N-Methylmorpholin (4 ml) neutralisiert. Diese wurde zum oben gemischten Anhydrid zugegeben und über Nacht gerührt. Die Mischung wurde dann vom Harnstoff abfiltriert und das Filtrat wurde im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und nacheinander mit Natriumbicarbonatlösung, Wasser, 1N Salzsäure und Wasser gewaschen. Das Rohprodukt wurde auf einer Kieselgelsäule gereinigt, wobei Chloroform-Methanol (95:5) verwendet wurde. Die Fraktionen, welche das reine Produkt enthielten, wurden durch Dünnschicht-Chromatographie bestimmt, wobei das gleiche Lösungsmittel, wie für Stufe 2 verwendet wurde. Die geeigneten Fraktionen wurden gepoolt.

4. Entfernung der Schutzgruppen Z- und OBe

9 g des ungeschützten Tripeptides, welches in der obigen Stufe 3 hergestellt wurde, wurde in einer Essigsäure-Wasser-Methanol-Mischung in Gegenwart Pd/BaSO₄ über Nacht hydriert. Es wurde vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat wurde im Vakuum eingedampft, wobei ein öliges Rückstand erhalten wurde. Dieser wurde mit absolutem Ethanol und absolutem Ether trituriert, wobei 3 g eines kristallinen Produktes erhalten wurden. Das Produkt wurde durch Dünnschicht-Chromatographie unter Verwen-

5 dung eines Lösungsmittelsystems, das aus Butanol:Essigsäure:Wasser:Pyridin (20:6:11:24) zusammengesetzt war, geprüft.

Chemische Synthese von Diacetyl-L-lysyl-L-prolyl-L-Valyl-NH₂

Das geschützte Tripeptid, Diacetyl-L-lysyl-L-prolyl-L-valyl-NH₂, kann ebenfalls durch die chemischen Techniken hergestellt werden, wie sie in den obigen Stufen 1 bis 3 beschrieben sind. Beispielsweise würde in Stufe 1 das Ausgangsmaterial Diacetyl-konjugiertes Lysin sein. In Stufe 3 würde der Valinbenzylester durch Valyl-amid ersetzt.

Beispiel II:

Entzündungshemmende Aktivität

Die entzündungshemmende Aktivität des Tripeptides wurde an einem Tiermodell demonstriert, welche durch Sparrow und Wilhelm (1957), J. Physiol., 137: 51–65, entwickelt wurde. Dieses Modell stützt sich auf das Prinzip, das lokalisierte subcutane Injektionen von Histamin eine lokalisierte Zunahme der kapillaren Permeabilität bewirken. Bei der intravenösen Vorbehandlung des Testtieres mit blauer Farbe, rufen die lokalen Histamin-Injektionen blau gefärbte «Schwielen» rund um die Injektionsstelle hervor. Durch Vorverabreichung eines wirksamen, entzündungshemmenden Mittels war demnach die blaue Färbung der Histamin-induzierten Schwielen viel weniger ausgeprägt, wobei der Grad der Farbreduktion abhängig war vom entsprechenden Anteil und/oder der Potenz des verwendeten, entzündungshemmenden Mittels war. Die nicht-farbwechselnden, weissen Neuseeland-Kaninchen wurden für den Sparrow/Wilhelm-Test verwendet. Die Haut der Rücken der Kaninchen wurde 1 bis 2 Tage vor dem Versuch nahe geklammert, jedoch nicht enthaart und die Kaninchen wurden bis zum Test warmgehalten. Verschiedene Anteile des geschützten Tripeptides (Diacetyl-L-Lys-L-Pro-L-Val-NH₂) wurden intravenös in die Ohrvene ungefähr 5 Min. vor der intravenösen Injektion des blauen Farbstoffes injiziert. Die Kontrollkaninchen erhielten simulierte Injektionen. 5 Min. nach der Injektion des Mittels oder der Kontrolllösung erhielten die Kaninchen ungefähr 30 mg/kg blauen Pontamin-Farbstoff als 2,5%-Lösung in 0,45% Kochsalzlösung in eine exponierte Vene.

Unmittelbar nach den Farbstoff-Injektionen wurde das Histamin interdermal mit einem Volumen von 0,10 ml (1,25 mg Histamin/0,1 ml Volumen) an verschiedenen Stellen auf jeder Seite der Spina injiziert. Insgesamt wurde eine vertikale Reihe von 6 Injektionen auf jeder Seite der Spina gemacht. Die relative Intensität der resultierenden blauen Schwielen wurde durch unabhängige Beobachter 30 Min. nach der Histamin-Injektion durchgeführt. Die Resultate sind in der nachstehenden Tabelle 1 angegeben.

Tabelle I: Entzündungshemmende Aktivität des Tripeptides

Nr. der getesteten Tiere	Tripeptid-Dosis +	Resultat
3 (2E, 1C)*	5	E heller als C
3 (1E, 1C)	10	E heller als C
15 2 (1E, 1C)	5	E heller als C
2 (1E, 1C)	1,25	E heller als C
2 (1E, 1C)	0,625	kein Unterschied beobachtet

* E = Experiment; C = Kontrolle

+ Dosierungen in µg geschütztem Tripeptid pro kg Körpergewicht, intravenös verabreicht.

Wie aus den in Tabelle I dargestellten Resultaten hervorgeht, bewirken intravenöse Dosen bis hinunter zu 1,25 µg Tripeptid pro kg Körpergewicht eine merkliche Reduktion der Histamin-induzierten blauen Schwielenbildung und ist demzufolge indikativ auf eine wirksame entzündungshemmende Wirkung. Bei Dosen von 5 und 10 µg/kg war die beobachtete Reaktion sogar noch ausgeprägter. Es wird ebenfalls darauf hingewiesen, dass der entzündungshemmende Effekt des Tripeptides bei verhältnismässig niederen Dosen beobachtet wird, im Vergleich zu seiner antipyretischen Wirkung.

Beispiel III:

Carrageenan/Rattenpfoten-Ödemtest

Es wurde ein zweiter in vivo-Biotest für die entzündungshemmende Aktivität durchgeführt, wobei die Wirkung des Tripeptides mit derjenigen von Hydrocortison verglichen wurde. In diesem Test wurden die zwei Mittel in vergleichbaren Dosen verabreicht und auf ihre unabhängige Fähigkeit, die Carrageenan-induzierten Schwellungen von Rattenpfoten zu hemmen. Dieser Versuch, der Rattenpfoten-Ödemtest, wurde im allgemeinen durchgeführt, wie er typischerweise auf dem Fachgebiet ausgeführt wird, bei-

spielsweise wie durch Winter et al., (1962), Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 111: 544 oder in U.S. Patent 4 150 137 beschrieben ist.

Kurz gesagt, wurde der Test folgendermassen durchgeführt. Jeder der 24 männlichen Sprague-Dawley-Ratten wurde einer von vier Gruppen zugeordnet. Tripeptid-Behandlung und Kontrollen, ausgewählt gemäss Körpergewicht und ursprünglichem Pfortenvolumen. Hydrocortisonbehandlung und ausgewählte 5 Kontrollen. Das Volumen der rechten Hinterpfote der Test- und Kontrolltiere wurde unter Verwendung von Standard-Verfahren und einer volumetrischen Quecksilber-Verdrängungstechnik bestimmt. Die intraperitoneale Injektion des Tripeptides (Ac-Lys-Pro-Val-NH₂, 100 mg/kg, N=6) von Hydrocortison (100 mg/kg, N=6 oder Kochsalzlösung bestimmtes Volumen, N=12) wurde jeder Ratte verabreicht 1 Std. nachdem 0,5 ml einer 1%-Lambda-Carrageenan in Kochsalzlösung in die rechte hintere Pfofte des Tieres injiziert worden war und das Pfortenvolumen wiederum aufgezeichnet (Grundlinienmessung). Danach wurde 10 das Pfortenvolumen jede Std. während 4 Std. gemessen. Zum Vergleich der Wirkungen der beiden Behandlungen wurden die Pfortenvolumen der Versuchstiere, die in stündlichen Intervallen gemessen wurden als % der Volumenänderung ihrer entsprechenden passenden Kontrollen ausgedrückt. Die Resultate dieses Versuches sind in Fig. 2 dargestellt. Aus diesen Daten geht hervor, dass mit Ausnahme der ersten Std., wo Hydrocortison die Schwellung merklich hemmt ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test), kein merklicher Unterschied der Hemmung der Pforten-Ödeme durch Tripeptid und Hydrocortison ($p > 0,20$) festgestellt werden konnte. Diese Resultate zeigen, dass das Tripeptid die Entzündung ebenso hemmt, wie das klassische entzündungshemmende Mittel, wenn sie in gleichen Gewichts Dosen verabreicht wurden, ungeachtet von kleinen zeitlichen Unterschieden. Auf Basis der vorliegenden Resultate und der bekannten Wirkungen von Hydrocortison und der Entzündung beim Menschen kann geschlossen werden, dass Lys-Pro-Val zur Reduktion der Entzündung beim Menschen in Dosen verwendet werden kann, welche nicht merklich verschieden von demjenigen von Hydrocortison sind.

Die vorliegende Erfindung wurde mittels Erläuterungen und Beispielen beschrieben, wobei übliche Labortechniken verwendet wurden. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass gewisse Änderungen und Modifikationen durchgeführt werden können, ohne dass vom Geist und Umfang der Erfindung abgewichen wird. Zum Beispiel können, obwohl chemisch synthetisierte Tripeptide zur Demonstration ihrer Aktivität verwendet wurden, nach Ansicht der Erfinder, ebenfalls aus natürlichen Quellen isolierte Tripeptide verwendet werden, die ebenfalls gleich gut funktionieren. Überdies ist offensichtlich, dass die Verabreichung jedes Kupfersalzes, ob es sich um das Sulphat, Chlorid oder ein ähnliches Kupfersalz handelt, die gleiche Wirkung, wie das Chlorid bei der Verbesserung der Aktivität des Tripeptides zeigt. In ähnlicher Weise sollte, obschon die Aktivität unter Verwendung des intravenösen oder zentral verabreichten Tripeptides gezeigt wurde, das oral verabreichte Tripeptid bei höheren Dosen aktiv sein. Es ist für den Fachmann offensichtlich, dass diese und andere Modifikationen und Änderungen innerhalb 35 des Schutzbereiches der beiliegenden Ansprüche liegen.

Patentansprüche

1. Verwendung eines von α -MSH verschiedenen Peptides mit 3 bis 13 Aminosäuren und einer α -MSH entsprechenden Sequenz, welches die Tripeptid-Sequenz Lys-Pro-Val enthält oder eines biologisch äquivalenten Peptides, dessen Aminosäuren ähnliche hydropathische Indizes aufweisen, zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung von Entzündungen.

2. Verwendung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid Lys-Pro-Val ist.

3. Verwendung gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Tripeptid an seinem Amino- und/oder Carboxy-Terminus geschützt ist.

4. Verwendung gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Tripeptid an seinem Amino-Terminus acyliert oder an seinem Carboxy-Terminus amidiert ist.

5. Verwendung gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das geschützte Tripeptid an seinem Amino-Terminus acyliert und an seinem Carboxy-Terminus amidiert ist.

6. Verwendung gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das geschützte Tripeptid an seinem Amino-Terminus acetyliert und an seinem Carboxy-Terminus amidiert ist.

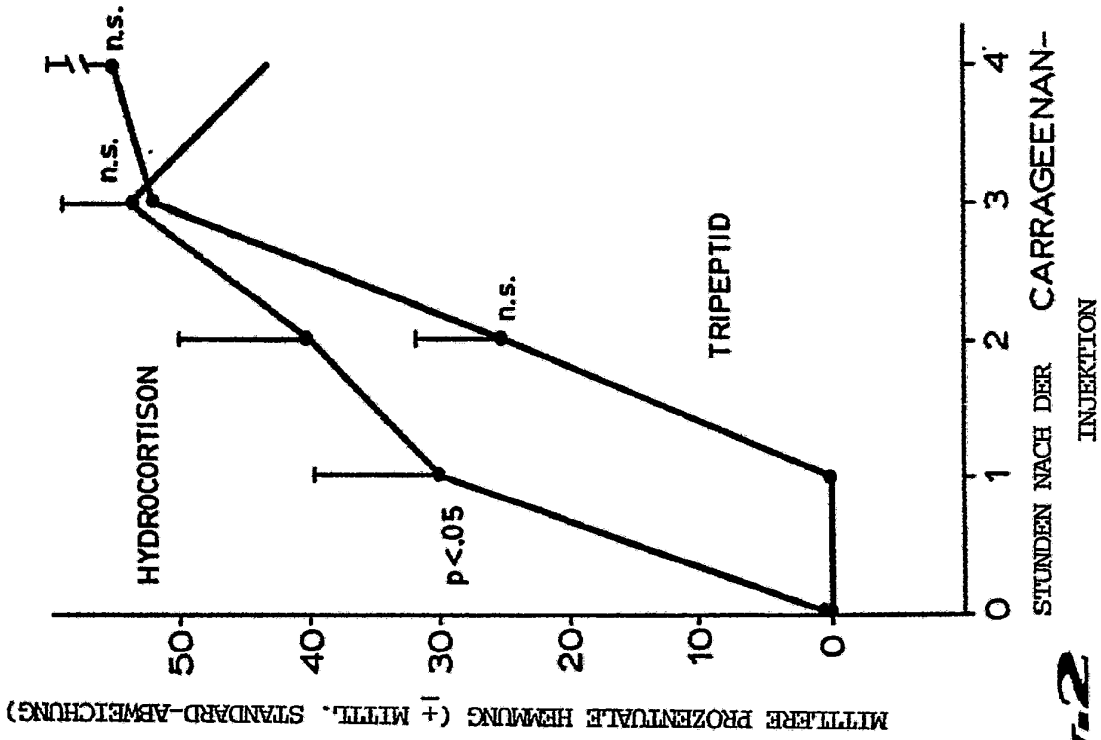


Fig. 2

Aminosäure-Sequenz
von Alpha-MSH

- NH₂ - SERIN - TYROSIN - SERIN -
- METHIONIN - GLUTAMINSÄURE
- HISTIDIN - PHENYLALANIN -
- ARGININ - TRYPTAMIN -
- GLYCIN - LYSIN - PROLIN -
- VALIN - COOH

Fig. 1