

(19) **DANMARK**



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **147733 B**



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 6207/73

(22) Indleveringsdag: 16 nov 1973

(41) Alm. tilgængelig: 18 maj 1974

(44) Fremlagt: 26 nov 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 17 nov 1972 DE 2256445

(51) Int.Cl.³: **C 07 C 103/52**
A 61 K 49/00

(71) Ansøger: ***HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT; 6230 Frankfurt/Main 80, DE.**

(72) Opfinder: **Hans *Wissmann; DE, Rolf *Gelger; DE, Rudolf *Schleyerbach; DE.**

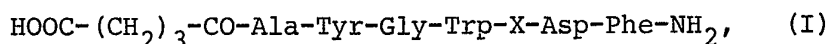
(74) Fuldmægtig: **Ingeniørfirmaet Budde, Schou & C0**

(54) **Gastrin-analoge heptapeptidderivater til anvendelse som diagnostika**

DK 147733 B

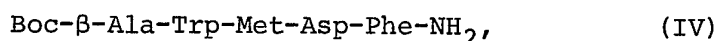
0

Opfindelsen angår hidtil ukendte gastrin-analoge heptapeptidderivater med den almene formel I



5 i hvilken X står for leucin eller methionin, til anvendelse som diagnostika.

Der er blevet beskrevet talrige syntetiske peptider fra det C-terminale område af gastrin, der på lignende måde som det naturlige hormon gastrin bevirker stimulation af maven med hensyn til syreproduktion og volumenudskillelse. Blandt disse syntetiske peptider 10 udmærker sig pentapeptidet med formlen IV



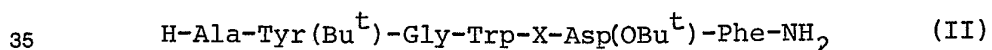
15 i hvilken Boc er en tert.butyloxycarbonylrest (The lancet 1966, s. 993). Pentapeptidet udviser den stærkeste stimulerende virkning i sammenligning med andre syntetiske peptider.

Dette pentapeptid IV er også allerede sammenlignet med et heptapeptid, der kun adskiller sig fra den her omhandlede forbindelse med formlen I med X = Met ved, at 20 glutaroylresten mangler. Det udviser en biologisk virkning, der kan sammenlignes med peptidet IV's.

Derimod har det her omhandlede peptid med formlen I, 25 i hvilken X står for methionin, en 1,3 gange så stor biologisk virkning som peptidet med formlen IV, det her omhandlede peptid med formlen I, i hvilken X = leucin, endda en 2,3 gange så stor virkning som peptidet med formlen IV, beregnet på molærbasis.

30 Den biologiske virkning er bestemt på perfunderede rottemaver ifølge Brit. J. Pharmacol. 38 (1970), s. 206-213.

Til fremstilling af forbindelserne med den almene formel I omsætter man f.eks. peptider med formlen II



35 hvori Bu^t betyder en tert.butylgruppe, og X har den ovenfor angivne betydning, med glutarsyreanhydrid i dimethylformamid, idet reaktionstider fra ca. 4 til ca. 20 timer ved

0 - 5°C er tilstrækkelige, opløsningsmidlet afdestilleres i vakuum, og remanensen udrives med ether. Beskyttelsesgrupperne spaltes fra med 90%'s trifluoreddikesyre ved stuetemperatur (reaktionstid ca. 1 time). Til rensning af peptiderne med den almene formel I er det tilstrækkeligt med for eksempel en omfældning fra alkohol/ether.

De her omhandlede hidtil ukendte peptider er diagnostika. De er fri for ikke-fysiologiske komponenter, stimulerer mavesaftproduktionen og kan derfor anvendes som diagnostika til undersøgelse af mavesækkens funktion.

Anvendelsen af de her omhandlede peptider ved mavefunktionsdiagnostik sker på i og for sig kendt måde, ved titrimetrisk analyse af den udskilte syre efter indgivelse af prøveforbindelsen, jf. L. Demling, "Der kranke Magen", München 1970, side 64-84, se især side 67-68. Peptiderne indgives herved subcutant eller intravenøst. I undtagelsestilfælde kan peptiderne også indgives ikke-panteralt.

Ved parenteral indgivelse anvendes en 0,001 til 0,1%'s opløsning i vand, eventuelt med tilsætning af fysiologiske mængder natriumchlorid, eller i en vandig pufferopløsning. Som puffer kan for eksempel anvendes 1/15 molar fosfat-puffer (primært kaliumphosphat og sekundært natriumphosphat ifølge Sørensen og Clark) med pH-værdier på 5,0 til 7,5. Disse opløsninger tjener til subcutan og intramuskulær anvendelse.

Til nasal anvendelse anvendes ca. 0,1%'s vandige opløsninger, 0,1 til 3%'s olieholdige suspensioner eller et 0,1 til 3%'s, tørt pulverpræparat med for eksempel lactose eller mannitol som bærer.

Fremstillingen af de her omhandlede peptider illustreres ved de følgende eksempler.

Eksempler

Til renhedsprøvning af de i det følgende fremstillede forbindelser anvendes tyndtlagschromatografi med følgende løbemiddelsystemer:

- 1) tert.-butanol/pyridin/petroleumsether, 1:1:8
- 2) methanol/vand 80:20
- 3) methylethylketon/pyridin/vand/iseddikesyre 70:15:15:2
- 4) butanol/eddikesyre/vand 2:1:1

Der anvendes de i peptidkemien sædvanlige forkortelser; dicyclohexylcarbodiimid = DCC; dimethylformamid = DMF. Z betyder benzyloxycarbonyl.

Eksempel 1.

Glutaroyl-Ala-Tyr-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂

a) Z-Tyr(Bu^t)-Gly-OCH₃

74 g (0,2 mol) Z-Tyr(OBu^t)-OH og 54 g (0,4 mol) 1-hydroxybenzotriazol opløses i 300 ml tetrahydrofuran, der afkøles til 5°C, og en opløsning af 42 g (0,2 mol) DCC i 50 ml tetrahydrofuran sættes til. Derpå efteromrøres i 1 time ved 0°C og 1 time ved stuetemperatur. Så skilles det udskilte dicyclohexylurinstof fra ved sugning. Til den tilbageblivende opløsning sættes ved 0°C en opløsning af 25 g (0,2 mol) glycin-methylester-hydrochlorid og 27 ml (0,2 mol) N-ethylmorpholin i 150 ml tetrahydrofuran. Derpå efteromrøres i endnu 2 timer ved stuetemperatur, så afdestilleres opløsningsmidlet i vakuum ved stuetemperatur, remanensen optages i ethylacetat og ethylacetatopløsningen rystes med 0,2 N svovlsyre, mættet natriumhydrogencarbonatopløsning og vand. Efter tørring af ethylacetatopløsningen over magnesiumsulfat fås slutproduktet ved afdampning af opløsningsmidlet i vakuum som en svagt gullig olie. Produktet kan ikke adskilles ved tyndtlagschromatografi i systemerne 1, 2, 3 og 4.

Udbytte: 64 g (73% af teoretisk)

b) H-Tyr(Bu^t)-Gly-OCH₃, HCl

60 g Z-Tyr(Bu^t)-Gly-OMe i 1 liter methanol hydrogeneres katalytisk ved en pH-værdi på 3 ved hjælp af 10 g 10%'s Pd/BaSO₄ under tilsætning af 1 N methanolisk HCl. Efter fraskillelse af katalysatoren afdestilleres opløsningsmidlet. Den tilbageblivende harpiks bliver fast ved udrivning med ether. Udbytte 45 g, smp. fra 97°C under opskumning. $[\alpha]_D^{20} = + 27,0^\circ$ (c = 1 i methanol).

0

c) Z-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OCH₃

Til en opløsning af 29 g (0,13 mol) Z-Ala-OH og 35 g 1-hydroxybenzotriazol i 240 ml DMF sættes ved 5°C 29 g DCC. Der omrøres 1 time ved 0°C og 1 time ved stuetemperatur, det udfældede dicyclohexylurinstof filtreres fra, og der tilsættes en opløsning af 44,8 g (0,13 mol) H-Tyr(Bu^t)-Gly-OCH₃, HCl og 16,5 ml N-ethylmorpholin i 300 ml DMF. Efter en reaktionstid på 3 timer ved stuetemperatur afdestilleres opløsningsmidlet i vakuum, re-

manensen optages i ethylacetat, og ethylacetatopløsningen mættes med 1 N HCl. Der vaskes med natriumhydrogencarbonat og vand, tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum. Det halvfast produkt bliver fast ved digereret med ether.

15 Udbytte: 46,5 g (70%). Smp. 107°C.

 $[\alpha]_D^{20} = -34,9^\circ$ (c = 1 i methanol)C₂₇H₃₅N₃O₇ (513) beregnet C = 63,1%, H = 6,8%, N = 8,2%.

fundet C = 63,4%, H = 6,9%, N = 8,1%.

20 Kan ikke adskilles ved tyndtlagschromatografi i systemerne 1 og 2.

d) Z-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH

44,6 g methylester fra c) i 150 ml dioxan og 89 ml 1 N natriumhydroxydopløsning omrøres i 1 time ved stuetemperatur. Der neutraliseres med 1 N HCl, inddampes i vakuum til 1/3 af det oprindelige volumen og pH-værdien ind-

stilles til 3 med 1 N HCl. Den udfældede olie optages i 700 ml ether. Til den over MgSO₄ tørrede opløsning sættes 250 ml petroleumsether. Bundfaldet udkrystalliserer ved 0°C i løbet af nogle dage.

30 Udbytte: 37,4 g (88%) smp. 89°C.

 $[\alpha]_D^{20} = -42,7^\circ$ (c = 1 i methanol)

Kan ikke adskilles ved tyndtlagschromatografi i systemerne 1 og 2.

35 e) Z-Trp-Leu-OH

83 g Z-Trp-Leu-OMe, fremstillet ifølge J. Org. Chem 31 (1966), s. 3400, omrøres i en blanding af 500 ml dioxan

0

og 100 ml 2 N NaOH i 100 minutter. pH-værdien indstilles til 6 med 1 N HCl, der inddampes, tilsættes noget vand, og pH-værdien indstilles til 3 med 1 N HCl. Det udfældede produkt omkrystalliseres fra methanol/vand.

5

Udbytte: 72,5 g, smp. 70°C,
 $[\alpha]_D^{20} = -27,5^\circ$ (c = 1 i methanol).

D

f) Z-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

10

Til en opløsning af 23,8 g (52 mmol) Z-Trp-Leu-OH, 19,5 g (42 mmol) H-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂·HCl, fremstillet ifølge J. Chem. Soc. (C) 1966, s. 555, 12 g N-hydroxy-succinimid og 6,65 ml N-ethylmorpholin i 400 ml tetrahydrofuran sættes ved -5°C under omrøring en opløsning af 10,8 g DCC i 18 ml tetrahydrofuran. Under omrøring afkøles frivilligt til stuetemperatur. Efter henstand natten over frafiltreres det udfældede dicyclohexylurinstof, og opløsningen indampes til tørhed i vakuum. Den tilbageblivende olie mættes med 5% citronsyre. Den digerer med natriumhydrogencarbonat og vand, tørres i vakuum over P₂O₅ og udkoges med lidt ethanol.

20

Udbytte: 31,5 g, smp. 212°C,
 $[\alpha]_D^{20} = -36,7^\circ$ (c = 1 i DMF)

D

Kan ikke adskilles ved tyndtlagschromatografi i systemerne 1, 2, 3 og 4.

25

g) H-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂·HCl

7,68 g Z-Tetrapeptid fra f) hydrogeneres katalytisk i 350 ml methanol analogt med eksempel 1b). Efter sædvanlig oparbejdning fås 6,5 g af et amorft produkt.

30

$[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ (c = 1 i methanol).

Kan ikke adskilles ved tyndtlagschromatografi i systemerne 1, 2, 3 og 4.

h) Z-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

35

0,5 g (1 mmol) Z-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH, 0,64 g (1 mmol) H-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂·HCl, 0,27 g (2 mmol) 1-hydroxybenzotriazol og 0,13 ml N-ethylmorpholin opløses i 10 ml

- 0 DMF, dertil sættes ved 0°C 0,24 g DCC, og der omrøres i
15 timer ved stuetemperatur. Det udfældede dicyclohexyl-
urinstof filtreres fra, og opløsningen indampes i vakuum.
Remanensen optages i ethylacetat og ekstraheres ved under
5 5°C med 10%'s citronsyre, hvorefter der vaskes med mættet
natriumhydrogencarbonat og vand. Efter tørring af ethyl-
acetatopløsningen over MgSO_4 indampes. Derved udfældes
450 mg af Z-heptapeptidet. Yderligere 193 mg lader sig
udvinde af moderluden ved fældning med ether. Smp. 192°C,
10 $[\alpha]_D^{20} = -27,8^\circ$ (c = 1 i DMF)
Aminosyreanalyse: Asp 1,0, Gly 0,99, Ala 1,02
Leu 0,98, Tyr 0,90, Phe 0,99 Tyr/Trp = 1,03
Kan ikke adskilles ved tyndtlagschromatografi i systemerne
1, 3 og 4.
- 15 i) H-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂, HCl
4 g Z-heptapeptid fra h) hydrogeneres katalytisk i 1,3
liter methanol analogt med eksempel 1b. Efter afdestille-
ring af opløsningsmidlet digererens remanensen med ether,
20 og der opnås 2,8 g med et smp. på 199-200°C (dekomponer-
ring).
k) Glutaroyl-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Leu-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂
Til en opløsning af 8,8 g (12 mmol) af H-heptapeptid-
25 hydrochloridet fra i) i 50 ml DMF sættes ved 0°C i løbet
af 40 minutter portionsvis under omrøring 2,3 g (20 mmol)
glutarsyreanhydrid og 2,56 ml N-ethylmorpholin. Der omrør-
res i 5 timer ved 0°C med påfølgende henstand i 16 timer
ved 4°C, opløsningsmidlet afdestilleres i vakuum, og rema-
nensen digererens med ether.
30 Udbytte: 8,8 g, smp. 230-232°C (dekomponering).
 $[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$ (c = 1 i DMF)
1) Glutaroyl-Ala-Tyr-Gly-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂
1,27 g af det beskyttede glutaroyl-heptapeptid fra k) om-
35 røres i 90 minutter ved stuetemperatur i 5 ml 90%'s tri-
fluoreddikesyre. Derefter afdestilleres trifluoreddikesyren

0

i vakuum, remanensen digerereres med ether og omfældes i ethanol/ether.

Udbytte: 620 mg. Smp. 213°C (dekomponering).

$[\alpha]^{20}_D = -33,8^\circ$ (c = 1 i DMF)

5 Aminosyreanalyse: Asp 1,09, Gly 1,00, Ala 1,07,
Leu 1,08, Tyr 0,69, Phe 1,02

Tyr/Trp $\approx 1,02$

Kan ikke adskilles ved tyndtlagschromatografi i systemerne 2, 3 og 4.

10

Eksempel 2

Glutaroyl-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

a) Z-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

15 17,7 g Z-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-OH, fremstillet ifølge eksempel 1d), 23 g H-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂, fremstillet ifølge J. Chem. Soc. (C), 1967, s. 2410, og 9,6 g 1-hydroxybenzotriazol opløses i 120 ml DMF. Ved 0°C tilsættes 8g DCC, og der omrøres natten over ved stuetemperatur. Efter frafiltrering af dicyclohexylurinstoffet indampes opløsningen i vakuum, remanensen udrides med vand, 0,2 N HCl, mættet natriumhydrogencarbonat og vand og tørres i højvakuum over P₂O₅.

Udbytte: 37,3 g, smp. 228°C.

$[\alpha]^{20}_D = -27,9^\circ$ (c = 1 i DMF)

25 $C_{59}H_{75}N_9O_{12}S$ (1133) Beregnet: C=62,5%, H=6,62%, N=11,1%, S=2,82%,
Fundet: C=62,6%, H=6,7%, N=11,1%, S=2,9%.

b) H-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

30 37 g af Z-heptapeptidet fra a) hydrogeneres katalytisk i 400 ml DMF under tilsætning af 15 ml cyclohexylamin og rigeligt Pd. Efter at fraspaltningen af Z-gruppen er sket, filtreres katalysatoren fra, opløsningen indampes til tørhed i vakuum, og remanensen udrides med ether. For at rense produktet yderligere fældes fra DMF/ether/petroleums-
35 ether.

Udbytte: 24,3 g, smp. 209°C (dekomponering),

$[\alpha]^{20}_D = -22,5^\circ$ (c = 1 i DMF)

D

0

c) Glutaroyl-Ala-Tyr(Bu^t)-Gly-Trp-Met-Asp(OBu^t)-Phe-NH₂

5

Til en opløsning af 12 g H-heptapeptidet fra b) i 60 ml DMF sættes portionsvis under omrøring ved 0°C i løbet af 40 minutter 3 g glutarsyreanhydrid og 4,3 ml N-ethylmorpholin. Der omrøres endnu 5 timer ved 0°C med påfølgende henstand i 16 timer ved 4°C. Så afdestilleres opløsningsmidlet i vakuum, og remanensen digerereres med ether.

10

Udbytte: 10,3 g, smp. 231°C (dekomponering).

$[\alpha]_D^{20} = -31^{\circ}$ (c = 1 i DMF)

d) Glutaroyl-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

15

10,1 g af det beskyttede glutaroylheptapeptid fra c) opløses i 50 ml 90%'s trifluoreddikesyre. Efter 75 minutters henstand ved stuetemperatur afdestilleres trifluoreddikesyren i vakuum, remanensen digerereres med 10 ml ethanol, og derpå tilsættes 100 ml ether.

For at rense produktet omfældes fra methanol/ether.

20

Udbytte: 9,65 g, smp. 216°C,

$[\alpha]_D^{20} = -31,2^{\circ}$ (c = 1 i DMF).

Aminosyreanalyse: Asp 0,96, Gly 0,94, Ala 0,93, Met 0,85,

Tyr 0,99, Phe 1,00

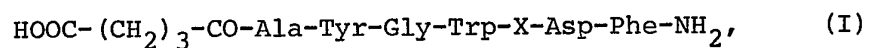
Tyr/Trp = 1,04

0

P a t e n t k r a v.

Gastrin-analoge heptapeptidderivater til anvendelse som diagnostika, k e n d e t e g n e t ved, at de har den almene formel I

5



i hvilken X står for leucin (Leu) eller methionin (Met).

Fremdragne publikationer:
