

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149632 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 4019/83

(51) Int.Cl.⁴: C 07 K 7/32

(22) Indleveringsdag: 02 sep 1983

(24) Løbedag: 06 apr 1977

(41) Alm. tilgængelig: 02 sep 1983

(44) Fremlagt: 18 aug 1986

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 1540/77

(30) Prioritet: 08 apr 1976 DE 2615229

(71) Ansøger: *HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Frankfurt/Main, DE.

(72) Opfinder: Wolfgang *Koenig; DE, Rolf *Gelger; DE, Rainer *Obermeier; DE, Volker *Teetz; DE.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af sekretin

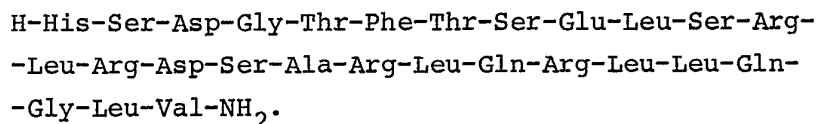
DK 149632 B

0

Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til fremstilling af sekretin.

Sekretin, et hormon af duodenum, er et heptacosapeptidamid med formlen

5



10

Det stimulerer bugspytkirtlens hydrogencarbonatproduktion og anvendes klinisk til undersøgelse af pankreasfunktionen.

Det er kendt at fremstille sekretin ved forskellige metoder (jfr. J. Amer.Chem. Soc. 89 (1967), side 6753;

15

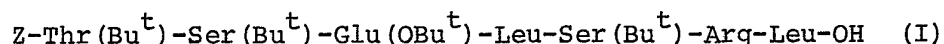
J. Amer. Chem. Soc. 90, (1968), side 4711; Chem. Ber. 105, (1972), side 2508 og Chem. Ber. 107 (1974), side

215). Disse kendte metoder er imidlertid ikke velegnet til fremstilling af større mængder sekretin, da f.eks. en utilstrækkelig opløselighed af fragmenter forhaler reaktionshastigheden ved peptidkoblingen.

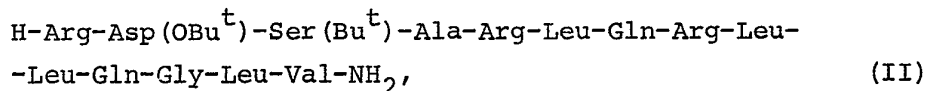
20

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af sekretin med den ovenfor anførte formel ved kondensation af

25

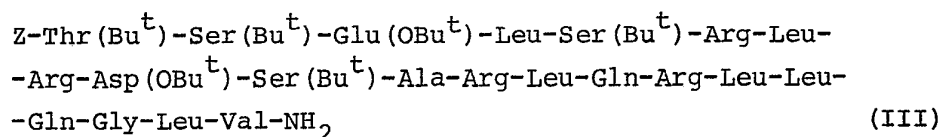


med



30

katalytisk hydrogenering af det fremstillede peptid

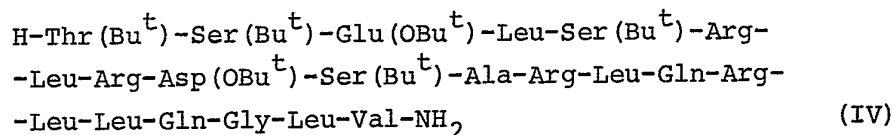


35

0

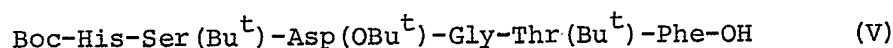
med en palladiumkatalysator og efterfølgende kondensation af det fremstillede peptid

5



med

10



15

20

25

og fraspaltning af beskyttelsesgrupperne med trifluoreddikesyre, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man ved kondensationerne foraktiverer peptidfragmenterne I hhv. V i dimethylacetamid eller en blanding af dimethylformamid og dimethylacetamid med 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin og dicyclohexylcarbodiimid, hvorved tilstedeværelsen af pyridinhydrobromid er nødvendig ved foraktivering af fragment I, renses det ud fra I og II fremstillede peptid III ved behandling i methanol, gennemfører den katalytiske hydrogenering af III i 80-90 vol.-%'s vandig 2,2,2-trifluorethanol, eventuelt renses det fremkomne peptid IV med methanol, ved kondensationen af IV med V forud opløser peptidet IV i en dimethylformamid/dimethylacetamid-blanding, og gennemfører fraspaltningen af beskyttelsesgrupperne i nærværelse af 5-20 vol.-%'s 2-6 N HCl eller HBr og/eller indtil 190 mg/ml cysteinhydrochlorid.

30

35

Ved sammenknytningen af I med II har man hidtil anvendt dicyclohexylcarbodiimid/1-hydroxybenzotriazol (DCC/HOBt)-metoden (jfr. Chem. Ber. 107, (1974), side 215). Carboxylkomponentens ekstremt tunge opløselighed frembyder imidlertid betydelige vanskeligheder. Til en 7,7 mmol-blanding anvendes der 400 ml dimethylformamid (DMF) som opløsningsmiddel. Ved den stærke fortynding aftager reaktionshastigheden stærkt, og der kræves en lang reaktionstid (2 dage).

0

Det har nu overraskende vist sig, at den tungt opløselige carboxylkomponent I let kan opløses i dimethylacetamid eller en blanding af DMF og dimethylacetamid (DMA) i nærværelse af pyridin-hydrobromid og 3-hydroxy-4-oxo-
5 -3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin (HOOBt). Udelader man en af komponenterne, nedsættes opløseligheden. Dette forhold er ideelt til en foraktivering af det tungt opløselige heptapeptid ved hjælp af DCC/HOOBt. Pyridin-hydrobromidet tjener til protonering af argininets frie
10 guanidinogruppe. Til opløsning af 10 mmol carboxylkomponent I er således allerede 50 ml DMF og 50 ml DMA tilstrækkeligt. Foraktiveringen varer 2 timer. Aminokomponent II (10 mmol) opløses ligeledes i f.eks. en blanding af 50 ml DMF og 50 ml DMA. Efter to timers sammenkoblingstid oparbejdes
15 blandingen. Det totale forbrug af opløsningsmiddel er altså 200 ml/10 mmol og den samlede reaktionstid 4 timer.

Også ved den sidste sammenkobling, nemlig sammenknytningen af V med IV til Boc-His-Ser(Bu^t)-Asp(OBu^t)-Gly-Thr(Bu^t)-Phe-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-
20 -Leu-Arg-Asp(OBu^t)-Ser-(Bu^t)-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂, er foraktiveringen af carboxylkomponenten med DCC/HOOBt enkeltbeholderfremgangsmåden med DCC/HOBt overlegen (jfr. Chem. Ber. 107, (1974) side 215), hvorved der igen anvendes DMA eller en blanding af DMF
25 og DMA som opløsningsmiddel for carboxylkomponenten og en blanding af DMF og DMA for aminokomponenten. Reaktionstiden forkortes her fra 36 til 6 timer.

Det ved kondensation af I med II fremstillede peptid III er hidtil blevet rensset ved udkogning med
30 ethylacetat (jfr. Chem. Ber. 107, (1974), side 215) eller ved omfældning fra methanol/ethylacetat (jfr. Chem. Ber. 105 (1972) side 2508). Disse rensningsprocesser har ved de tungt opløselige udgangsstoffer tydeligvis ingen større rensningseffekt. Det har overraskende vist sig,
35 at materialet kan udkoges med methanol, hvorved der opnås en stærkere rensningseffekt, hvilket står i

0

modsatning til sidstnævnte kendte teknik (Chem. Ber. 105, (1972) 2508), ifølge hvilken peptidet er opløseligt i methanol.

5

Den katalytiske hydrogenering af III til IV har hidtil været foretaget i en blanding af methanol og DMA (143 ml/g), jfr. Chem. Ber. 107, 215) eller i 80%'s eddikesyre (269 ml/g, jfr. Chem. Ber. 105, 2908). Til den katalytiske hydrogenering har det nu vist sig, at 80-90 vol.-%'s 2,2,2-trifluorethanol (mindst 11 ml/g peptid) er særlig egnet som opløsningsmiddel. Dette opløsningsmiddel har i forhold til eddikesyre den fordel, at der ikke kan finde acetylering sted. I blandingen af methanol/DMA var det med methanol rensede produkt III praktisk talt uopløseligt.

15

Efter den katalytiske hydrogenering kan det fremstillede $5\text{HBr}\cdot\text{H-Thr}(\text{Bu}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Glu}(\text{OBU}^t)\text{-Leu-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Arg-Leu-Arg-Asp}(\text{OBU}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH}_2$ (IV) igen renses godt ved udkogning med methanol, skønt produktet ifølge Chem. Ber. 105, (1972), side 2508 beskrives som opløseligt i methanol.

20

Det således fremstillede beskyttede sekretin behandles til fraspaltning af beskyttelsesgrupperne i trifluoredikesyre, til hvilken der er sat 5-20%'s 2-6 N vandig saltsyre eller hydrogenbromidsyre og/eller indtil 190 mg/ml cysteinhydrochlorid. Ved denne fremgangsmåde fås der et råt sekretin med højere aktivitet end ved fraspaltning af beskyttelsesgrupperne på gængs måde med trifluoredikesyre.

25

Sekretin anvendes som diagnostikum ved kontrollering af de ekskretoriske pankreasfunktioner og som terapeutikum ved Ulcus duodeni.

30

Eksempel

$\text{Z-Thr}(\text{Bu}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Glu}(\text{OBU}^t)\text{-Leu-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Arg-Leu-Arg-Asp}(\text{OBU}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH}_2$.

35

Til en opløsning af 12 g $\text{Z-Thr}(\text{Bu}^t)\text{-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Glu}(\text{OBU}^t)\text{-Leu-Ser}(\text{Bu}^t)\text{-Arg-Leu-OH}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,6 g pyridin-hydrobromid og

0 1,63 g 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazin
 i en blanding af 50 ml dimethylformamid og 50 ml
 dimethylacetamid sættes der 8,4 g dicyclohexylcarbodi-
 imid, og der omrøres i to timer ved stuetemperatur. I
 5 mellemtiden opløses 18,8 g H-Arg-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-
 -Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂·4 HBr og
 5,2 ml N-ethylmorpholin i en blanding af 50 ml dimethyl-
 formamid og 50 ml dimethylacetamid, og den foraktiverede
 blanding filtreres ind i denne opløsning. Der efterrøres
 10 nu yderligere to timer ved stuetemperatur, og blandingen
 røres i 3 liter ethylacetat. Det udfældede bundfald fraskilles
 ved sugning, koges op en gang med ethylacetat og fraskilles
 igen ved sugning. Til yderligere rensning koges remanensen
 nu en gang op med 200 ml methanol, og der fraskilles
 15 ved sugning. Derefter irøres der endnu en gang ethylacetat,
 koges op, afkøles, fraskilles ved sugning og tørres.
 Udbytte: 23,1 g, smp. 262-265°C $[\alpha]_D^{20} = -22,4^{\circ}$ (c = 1,
 i 80% eddikesyre).

20 H-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-Leu-Arg-
 -Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-
 -Leu-Val-NH₂·5 HBr

6 g Z-Thr(Bu^t)-Ser(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Leu-Ser(Bu^t)-Arg-
 -Leu-Arg-Asp(OBu^t)-Ser(Bu^t)-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-
 25 -Gln-Gly-Leu-Val-NH₂ og 300 mg pyridinhydrochlorid opløses
 i 70 ml 80%'s 2,2,2-trifluorethanol. Der tilsættes en
 smule Pd/carbon-katalysator, og hydrogen ledes igennem.
 Efter afsluttet hydrogenering (ingen CO₂ i afgangsgassen)
 fraskilles katalysatoren ved sugning, og trifluorethanolet
 30 afdestilleres. Remanensen udrides med ethylacetat og
 fraskilles ved sugning. Til yderligere rensning koges
 der op med methanol. Remanensen får lov at antage stue-
 temperatur, og der fraskilles ved sugning. Dernæst koges
 der endnu en gang op med ethylacetat, afkøles og fraskilles
 35 ved sugning. Udbytte: 4,58 g, $[\alpha]_D^{20} = -26,1^{\circ}$ (c = 1, i 80%
 eddikesyre).

0

Boc-His-Ser (Bu^t)-Asp (OBU^t)-Gly-Thr (Bu^t)-Phe-Thr (Bu^t)-Ser (Bu^t)-
 -Glu (OBU^t)-Leu-Ser (Bu^t)-Arg-Leu-Arg-Asp (OBU^t)-Ser (Bu^t)-Ala-
-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂.

5 Til en opløsning af 4,24 g Boc-His-Ser (Bu^t)-Asp (OBU^t)-
 -Gly-Thr (Bu^t)-Phe-OH og 709 mg 3-hydroxy-4-oxo-3,4-dihydro-
 -1,2,3-benzotriazin i 17 ml dimethylacetamid sættes der
 ved 0°C 2,87 g DCCI. Der omrøres i en time ved 0°C og en
 time ved stuetemperatur. I mellemtiden opløses 13,7 g
 H-Thr (Bu^t)-Ser (Bu^t)-Glu (OBU^t)-Leu-Ser (Bu^t)-Arg-Leu-Arg-
 10 -Asp (OBU^t)-Ser (Bu^t)-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-
 -Leu-Val-NH₂·5HBr i en blanding af 87 ml dimethylformamid
 og 87 ml dimethylacetamid til en géléagtig masse. Til
 denne géléagtige opløsning sættes der 1,13 ml N-ethylmorpho-
 lin, der fortyndes med 22 ml dimethylacetamid, og den for-
 15 aktiverede blanding suges dertil. Der omrøres nu i to timer
 ved stuetemperatur. I mellemtiden tilberedes der som
 ovenfor yderligere en foraktiveret blanding, der derpå
 atter filtreres ind i reaktionsblandingen. Der omrøres
 derefter igen i to timer ved stuetemperatur, og i den
 20 géléagtige opløsning røres der 1740 ml varm ethylacetat.
 Der afkøles til stuetemperatur, og bundfaldet fraskilles
 ved sugning. Bundfaldet koges endnu en gang op med ethyl-
 acetat, fraskilles ved sugning og tørres. Udbytte: 17 g.

25 Råt sekretin

1,5 g af det ovenfor fremstillede beskyttede
 sekretin og 150 mg cysteinhydrochlorid opløses i en
 blanding af 15 ml trifluoreddikesyre og 1,5 ml 4 N HCl.
 Blandingen henstår i 30 minutter ved stuetemperatur, ind-
 30 dampes og opløses i vand, og opløsningen frysetørres.
 Udbytte: 1,69 g.

Det fremkomne rå sekretin renses på følgende måde:

1,69 g rå sekretin opløses i ca. 10 ml 0,001 N
 cysteinhydrochlorid-opløsning og chromatograferes på en
 35 "Sephadex[®] LH-20"-søjle (200 x 4 cm). Der elueres med
 0,001 N cysteinhydrochlorid-opløsning, og der opfanges

0

fraktioner på 300 dråber. De gode sekretinfraktioner er i den nedadgående gren af den første top (ca. 32.-37. fraktion). De sekretinholdige fraktioner forenes og frysetørres, og der fås et udbytte på ca. 400 mg. I de efter-

5 følgende fraktioner kan der yderligere udvindes ca. 80 mg let forurenset sekretin. Hovedfraktionen på 400 mg har ifølge aminosyreanalyse et peptidindhold på 65% og en biologisk aktivitet på 2600 enheder pr. mg. Dette svarer til en aktivitet på 4000 enheder pr. mg peptidbase.

10

Udbytte henført til beskyttet sekretin: 22%. Foruden salte og vand indeholder det således isolerede sekretin yderligere ca. 5% cysteinhydrochlorid.

15

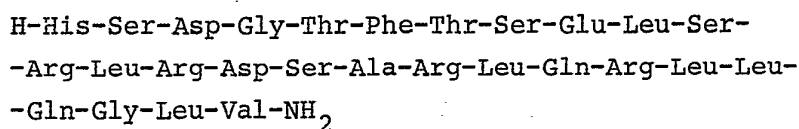
Aminosyreanalyse: Asp (2,0), Thr (1,9), Ser (3,1), Glu (3,0), Gly (2,0), Ala (1,1), Cys (0,7), Val (1,1), Leu (6,0), Phe (1,0), His (1,0) og Arg (3,9).

0

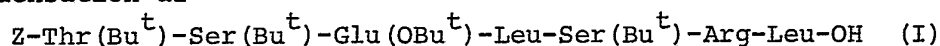
P A T E N T K R A V.

Fremgangsmåde til fremstilling af sekretin med
formlen

5

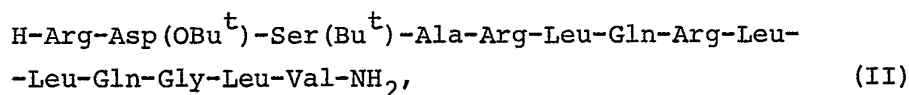


ved kondensation af



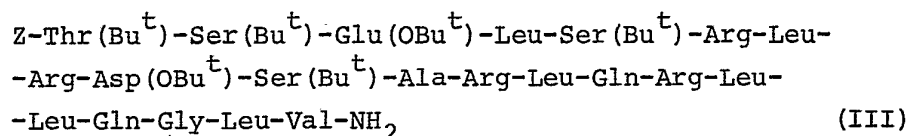
10

med



15

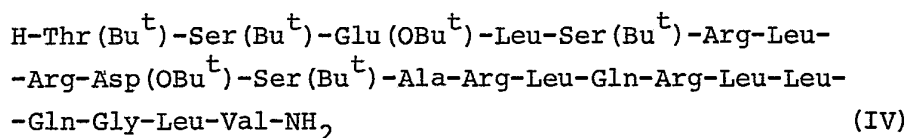
katalytisk hydrogenering af det fremstillede peptid



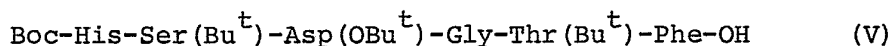
20

med en palladium-katalysator, efterfølgende kondensation af
det fremstillede peptid

25



med



30

og fraspaltning af beskyttelsesgrupperne, Z, Boc og Bu^t
med trifluoreddikesyre, k e n d e t e g n e t ved, at
man ved kondensationerne foraktiverer peptidfragmenterne
I hhv. V i dimethylacetatamid eller en blanding af dime-
thylformamid og dimethylacetamid med 3-hydroxy-4-oxo-3,4-
35 -dihydro-1,2,3-benzotriazin og dicyclohexylcarbodiimid,

0
hvorefter tilstedeværelsen af pyridinhydrobromid er nødven-
dig ved foraktivering af fragment I, renses det ud fra
I og II fremstillede peptid III ved behandling i methanol,
gennemfører den katalytiske hydrogenering af III i 80-
5 -90 vol.-%'s vandig 2,2,2-trifluorethanol, eventuelt ren-
ses det fremkomne peptid IV med methanol, ved kondensa-
tionen af IV med V forud opløser peptidet IV i en dime-
thylformamid/dimethylacetamid-blanding, og gennemfører fra-
spaltningen af beskyttelsesgrupperne i nærværelse af
10 5-20 vol.-% 2-6 N HCl eller HBr og/eller indtil 190 mg/ml
cysteinhydrochlorid.

Fremdragne publikationer:
