



237288

# REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

**PATENTE DE** ..... **INVENCION.** .....

## MEMORIA DESCRIPTIVA

*que se acompaña a la solicitud de*

una **PATENTE DE** ..... **INVENCION** ..... por 20 años, en España

*a favor de*

CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza, ..... , de nacionalidad

..... domiciliado en Basilea, Suiza. ....

calle de ..... núm. ....

*por:*

• Procedimiento para la obtención de polipeptidas nuevas y de sus derivados".  
.....  
.....

Nº 3181

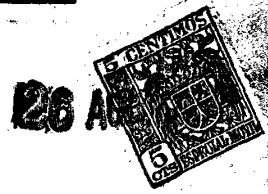
Agente Sr. Gómez-Acebo y Mada

PATENTE DE INVENCIÓN

CIBA Case 3711/1-3.

237288

237288



MEMORIA DESCRIPTIVA

sobre:

"Procedimiento para la obtención de polipeptidas nuevas y de sus derivados".

Solicitante : CIBA SOCIÉTÉ ANONYME, entidad suiza,  
residente en Basilea, Suiza.

El objeto de la presente invención es la obtención de octapeptidas con efecto hipertensínico. En la hipertensina se trata, como es sabido, de una hormona con efecto incrementador de la presión sanguínea, que primeramente se obtuvo de la sangre de las reses. La aclaración de la constitución dió por resultado que la hipertensina es una decapeptida con la secuencia ácido amínica L-ácido asparagínico, L-arginina, L-valina, L-tirosina, L-valina, L-histidina, L-prolina, L-fenilalanina, L-histidina, L-leucina. En la secuencia se

5.

10.

26 AG



237288

descubrieron otras dos hipertensinas más: Hipertensina I, que aparece en la sangre del caballo y que en lugar del 5 resto de ácido amínico (valina) contiene el resto de la iso-leucina, y la hipertensina II, una octapeptida que en su estructura corresponde a la hipertensina I pero que no contiene los dos últimos restos ácidos amínicos.

5. Se ha descubierto, que las octapeptidas con la secuencia ácido amínica L-asparagina, L- $\alpha$ -(amino-alkali bajo)-amino-ácido acético, L- $\alpha$ -amino-alkali bajo-ácido acético, L-tirosina, L- $\alpha$ -amino-alkilo bajo-ácido acético, L-histidina, L-prolina, L-fenilalanina también tienen un efecto hipertensivo muy bueno y que además, también los derivados funcionales de estos compuestos, por ejemplo las N-acilo-asparaginilo-octapeptidas u octapeptidas cuyo grupo amino del resto amidínico está nitrado o cuyo grupo carboxílico final está esterificado, obtenidas como productos intermedios durante el procedimiento de obtención, son de igual eficacia y aplicación. El efecto se mantiene asimismo cuando la molécula de octapeptida está simultáneamente modificada funcionalmente en varios lugares en la forma descrita. Esto es de importancia técnica, ya que los mencionados productos intermedios son de acceso más fácil y por lo tanto más económico. Lo mismo tiene validez con respecto al empleo de las octapeptidas en general en comparación con las ya conocidas decapeptidas y en especial con relación a las octapeptidas que, en lugar del resto valílico, contienen el resto de un ácido amínico de más fácil accesibilidad. Asimismo significa, en la ejecución técnica del procedimiento, un progreso al empleo de una octapeptida que en lugar del resto del ácido asparagínico contenga el resto asparagínico.

30. Las mencionadas octapeptidas se pueden emplear

237288

26 A



también como productos intermedios para la obtención de otros compuestos activos. Así por ejemplo se puede transformar el resto amídico de la asparagina, mediante ácidos o álcalis, con reacción más prolongada, en el grupo carboxílico; si se parte de la L-asparaginilo-L-arginilo-L-valililo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina entonces se obtiene hipertensina II, con lo que por primera vez se ha descrito la síntesis de esta hormona.

En la síntesis estructural indicada de las nuevas octapeptidas se entenderán bajo los restos del ácido  $\alpha$ -amino-alquilo- bajo-ácido acético, en primer lugar, valilo y norvalilo, además leucilo, iso-leucilo y norleucilo, así como alanilo, entran por lo tanto preferentemente en consideración restos de ácidos amínicos naturales. En los  $\alpha$ -(amino-alquilo bajo)-amino-ácidos acéticos arriba mencionados puede estar asimismo sustituido el grupo amino del resto alquilo bajo, p.e. por un grupo amidínico o carbamílico, donde los grupos amínicos libres pueden estar, en caso dado, protegidos, preferentemente por un resto dissociable mediante hidrólisis o reducción, como un grupo tosílico. Como  $\alpha$ -(amino-alquilo bajo)-amino-ácidos acéticos entran especialmente en consideración arginina, lisina, ornitina, ácido  $\alpha$ ,  $\gamma$ -diaminobutírico o citrulina.

Existe un gran número de posibilidades para la obtención de las nuevas peptidas. Ventajosamente se partirá de una L-asparagina cuyo grupo amino esté protegido mediante un resto dissociable por reducción o hidrólisis y de una L-arginina cuyo grupo amino de la agrupación amidínica esté protegido mediante un resto dissociable por reducción o hidrólisis, preferentemente por un grupo nitro, y se unen entre sí los restos de una L-asparagina con grupo amino protegido, una L-arginina con grupo amidínico protegido, un L-  $\alpha$ -amino-alquilo



237288

bajo-ácido acético, una L-tirosina con grupo oxi libre o sustituido como uno de sus ésteres o éter, un L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácido acético, de la L-histidina, de la L-prolina y un éster L-fenilalanínico en forma amídica bajo formación de una octapeptida con la mencionada secuencia de los restos de ácido aminocarbónico mencionados y en la polipeptida así obtenida se liberan el grupo carboxílico esterificado del resto fenilalanínico, los grupos amino protegidos de los restos de la asparagina y arginina y en caso dado un grupo oxi sustituido del resto tirosínico y, si se desea, el grupo carbonilamídico del resto asparagínico se transforma en un grupo carboxílico libre.

Una forma de ejecución conveniente del procedimiento consiste en que Nitro-L-arginina se acila con una L-asparagina que presenta un grupo amino protegido. La L-asparaginilo-nitro-L-arginina así obtenida se puede entonces condensar con un éster de L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-tirosilo-L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-histidilo-L-propilo-L-fenilalanina a la octapeptida deseada. Pero también se puede condensar una L-asparaginilo-nitro-L-arginina con L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-tirosina a una asparaginilo-nitro-L-arginilo-L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-tirosina y ésta reaccionarla a octapeptida con un éster L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanínico. Además es posible acilar L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-tirosilo-L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-histidina con una L-asparaginilo-nitro-L-arginina y reaccionar la L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-

237288

26



tirosilo-L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-histidina con L-prolilo-L-fenilalanina a la octapeptida.

Las polipeptidas mencionadas durante la acilización se pueden obtener por diferentes medios.

5. Así pues se puede por lo pronto condensar L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácido acético con L-tirosina a L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-tirosina, así como con L-histina a L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-histidina y finalmente L-prolina con éster L-fenilalanínico a éster L-prolilo-L-fenilalanínico.
10. La L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-histidina así obtenida se acila entonces con la L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-tirosina a L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-tirosilo-L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-histidina. Pero también se puede condensar el
15. L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácido acético con la L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-tirosina a L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-acetilo-L-tirosilo-L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácido acético y éste entonces con L-histidina.

- En las acilizaciones arriba descritas se pueden
20. emplear los procedimientos conocidos para la obtención de polipeptidas. Para ello se deben proteger pasajera-mente los grupos amino libres que no participan en la reacción, especialmente mediante restos dissociables por hidrólisis, como por ejemplo por el resto carbo-benziloxílico. Los ácidos amínicos a acilar se emplean
25. convenientemente en forma de sus ésteres. Como métodos de acilización sea mencionada la reacción de un ácido con la correspondiente amida de fosfito, como por
- ejemplo con la correspondiente amida dietilofosfítica,
30. la reacción de un ácido con el amina en presencia de una

237288<sup>26</sup>



5. carbohidrimida, como en presencia de la 1-ciclohexilo-3-(2-morfolinilo-(4)-etilo)-carbohidrimida y especialmente la reacción de una amina con un éster activado en el cual, como sustituyente activador, existe, en el componente alcohólico, ventajosamente el grupo ciano o nitro.

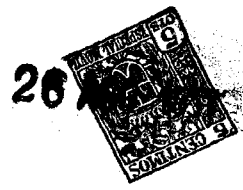
10. La transformación de un grupo amino protegido en un grupo amino libre, así como la transposición de un grupo carboxílico funcionalmente modificado en un grupo carboxílico libre, en el transcurso del procedimiento para la obtención de los diferentes polipeptidas y en especial en las octapeptidas obtenidas según el presente procedimiento, se efectúa por métodos en sí ya conocidos mediante tratamiento con agentes hidrolizantes o reductores.

15. En los productos del procedimiento obtenidos se pueden transformar los grupos carboxílicos libres, funcionalmente modificados, especialmente en éster o amidas. Además es posible sustituir grupos amino libres, como por ejemplo alquilizar o acilizar. Los productos del procedimiento se pueden obtener y emplear asimismo también en forma de sus sales.

20. Una modificación del procedimiento consiste en partir de cualquier producto intermedio obtenido en cualquier etapa del procedimiento y seguir efectuando las restantes etapas del procedimiento que faltan. Pero también se puede prescindir en cualquier etapa del procedimiento a la ejecución de las restantes etapas del procedimiento y, si se desea, liberar en la polipeptida obtenida un grupo carboxílico o hidroxílico funcionalmente modificado y/o grupos amino protegidos.

25.

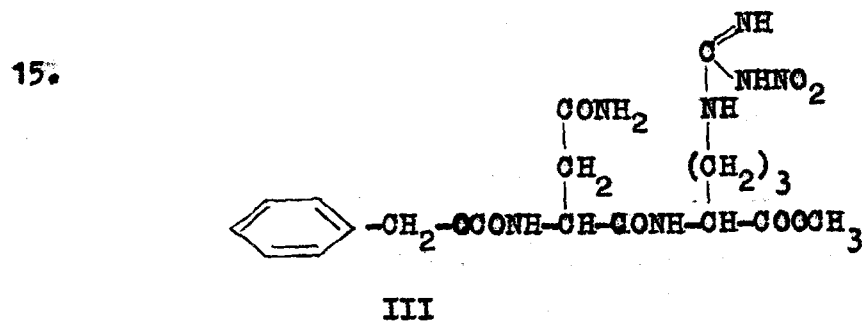
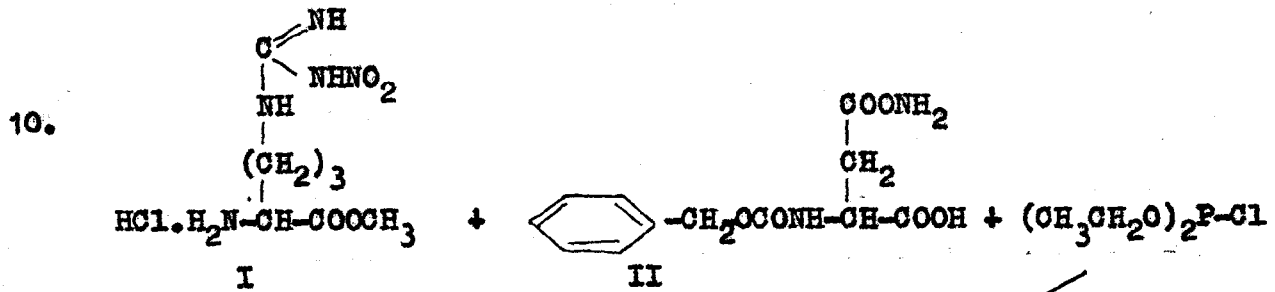
30.



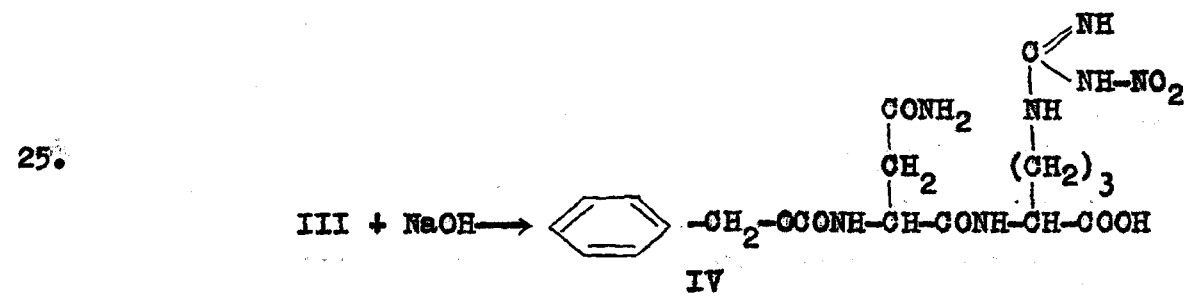
237288

Una forma de ejecución especial, tal y como se ha descrito en los primeros ejemplos siguientes, queda aclarada con más detalle por el siguiente esquema de fórmulas:

5. 1. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina (III).



20. 2. N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina (IV).

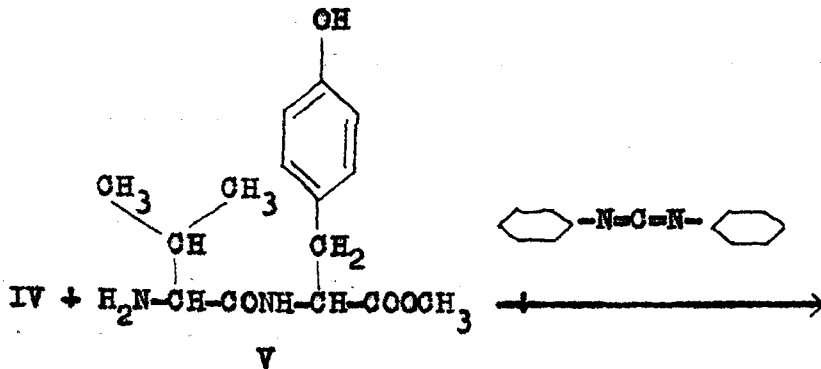




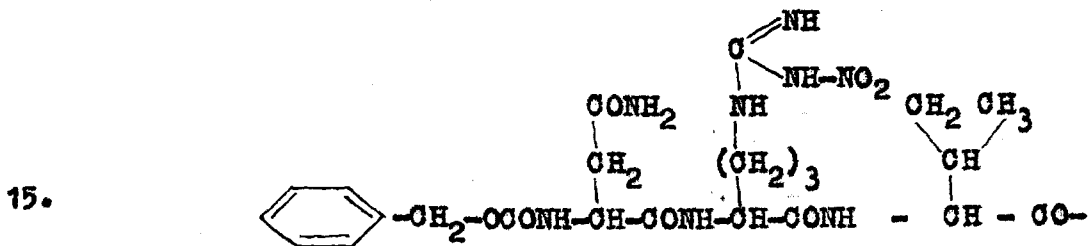
237288

3. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosina (VI).

5.

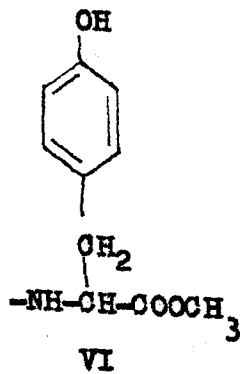


10.



15.

20.

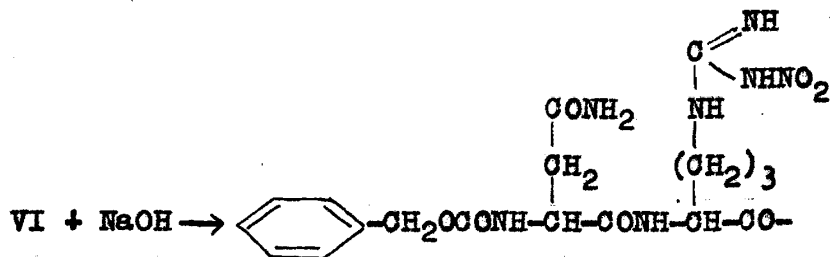




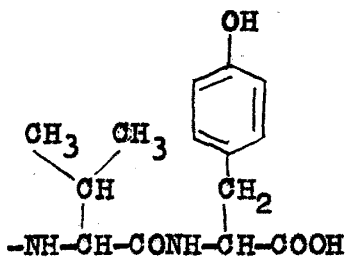
237288

4. N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosina (VII).

5.



10.

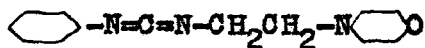
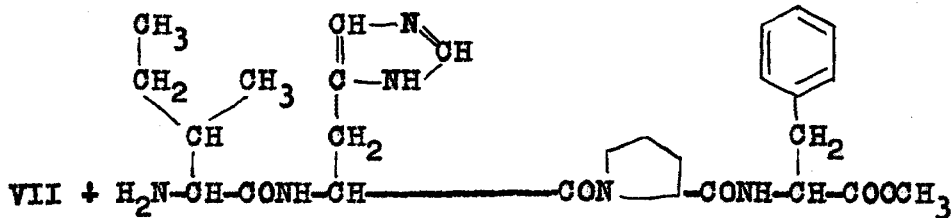


VII

15.

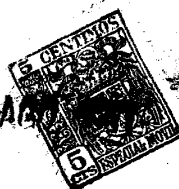
5. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-profílo-L-fenilalanina (IX).

20.

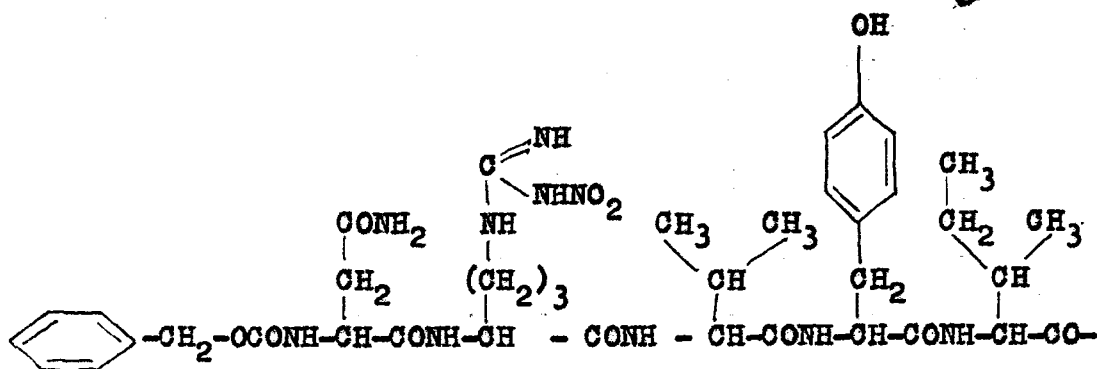


237288

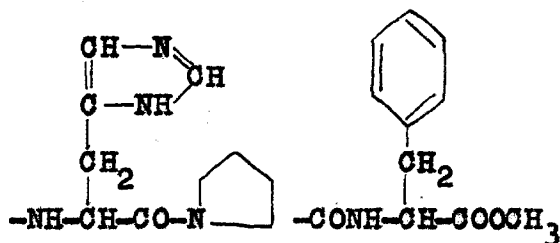
28 A



5.



10.

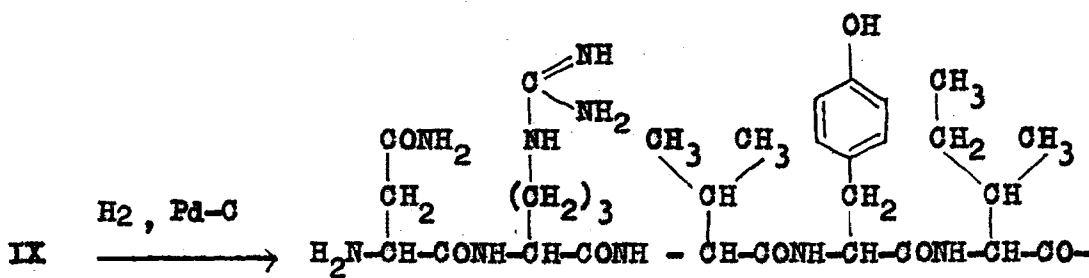


IX

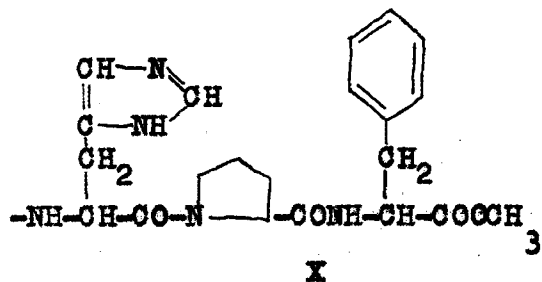
15.

6. Ester metílico de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (X).

20.



25.



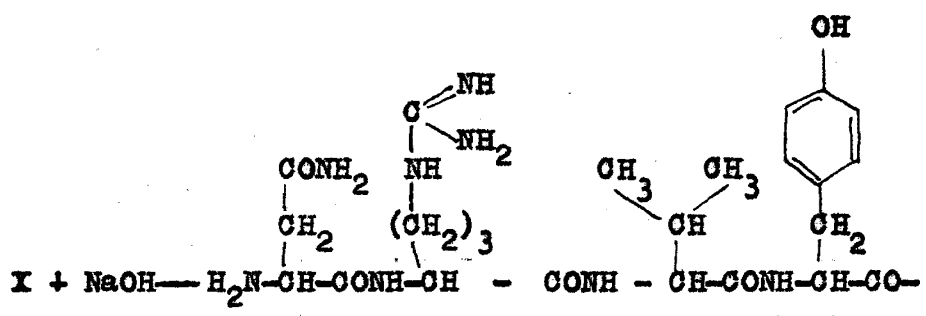
X



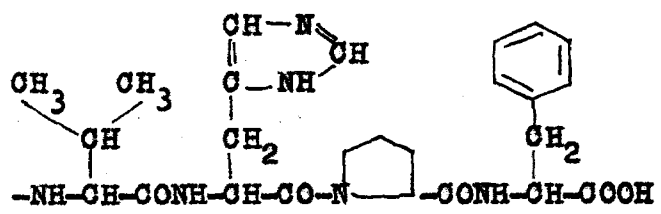
237288

7. L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (XI).

5.



10.



15.

XI

20.

25.

Las polipeptidas obtenidas según el presente procedimiento y sus derivados funcionales se pueden emplear como productos intermedios para la obtención de medicamentos o también como remedios en forma de preparados farmacéuticos. Estos contendrán las peptidas en mezcla con un vehículo orgánico o inorgánico farmacéutico, adecuado para la aplicación enteral, parental o local. Como tales entran en consideración aquellos materiales que no reaccionen con las peptidas, como por ejemplo gelatina, lactosa, glucosa, sal común, almidón, estearato



237288

- de magnesio, talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma, glicoles polialquilénicos, vaselina, colesteroína y otros vehículos medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos pueden presentarse por ejemplo como tabletas, grageas, polvos, ungüentos, cremas, supositorios, o en forma líquida como soluciones, suspensiones o emulsiones.
5. En caso dado estarán esterilizadas y/o contendrán agentes auxiliares tales como agentes de conservación, estabilización, destensión o emulsión. Asimismo podrán contener otras materias terapéuticamente valiosas.
- 10.

- La invención está descrita en los siguientes ejemplos sin que con ello se tenga la intención de limitar el objeto de la presente invención. Los ejemplos 1-15 se refieren a la obtención de la L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-propilo-L-fenilalanina, los ejemplos 16-26 a la de la L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina y los ejemplos 27-35 a la de la L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina. Estos compuestos se pueden saponificar por tratamiento con álcalis alcohólicos o acuosos, por ejemplo sosa cáustica en metanol, o con ácidos minerales acuosos o alcohólicos a las correspondientes asparagilo-octapeptidas. Las temperaturas están indicadas en grados Celsius.
- 15.
- 20.
- 25.

EJEMPLO 1.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina (III).

- a) 10,0 g de hidrocloreuro de éster metílico
30. de nitro-L-arginina (0,0371 mol) (I) se pulverizan



237288

5. finamente, se secan durante algunas horas a 60° en vacío y se suspenden en 100 ml de dioxano absoluto. Después de agregar 9,0 g (0,089 mol) de trietilcamina se agita durante 2 horas a temperatura de ambiente, se enfría a +10° y se gotean 7,1 g (0,0408 mol) de dietilodloro-
10. fosfito (aproximadamente 98%) disueltos en 20 ml de dioxano. Después de agitar durante 1 hora a temperatura de ambiente se filtra el cloruro trietilcamónico formado, se lava con poco dioxano y el filtrado se vaporiza en vacío a 80°. El residuo viscoso amarillento se mantiene con 40 ml de dietilofosfito y 9,85 g (0,0371 mol) de N-carbobenciloxi-L-asparagina (II) bien seca, durante 2 horas, a 80° (solución homogénea). Finalmente se vaporiza el disolvente a unos +50° en alto vacío, el
15. residuo aceitoso, que aun sigue conteniendo unos 5 g de dietilofosfito, se recibe en 60 ml de ácido clorhídrico 2-n y se extrae tres veces, cada una con 600 ml de éster acético. Los extractos éster-acéticos se lavan consecutivamente aún 2 veces con ácido clorhídrico 2-n,
20. 2 veces con bicarbonato de sodio saturado y 2 veces con agua. (Volumen de las soluciones acuosas: cada una 60 ml, siempre saturadas con sulfato de sodio). Después de secar con sulfato de sodio sólido y vaporizar en vacío se obtienen 9,9 g de una masa en su mayor parte cristalina. Esta se frota con 100 ml de agua caliente,
25. se deja enfriar y se filtra. El residuo (III) pesa, después de secar en alto vacío a 80°, 5,95 g (= 33 % d.T.) y muestra un punto de fusión de 150-165°.

30. b) Modificación: La condensación se puede efectuar también en dioxano sin la presencia de dietilo-



237288

5. fosfito. El cloruro trietiloamónico, que se forma durante la formación de la dietilofosfitoamida del éster metílico de la nitro-L-arginina, se filtra y el filtrado se condensa directamente con N-carbobenciloxi-L-asparagina: La mezcla se calienta durante 2 horas al reflujo con lo que una parte de la sustancia queda insoluble como capa aceitosa en el fondo.

10. El rendimiento es, con iguales cantidades que bajo a) de 6,10 g de dipeptida del punto de fusión de aproximadamente 145-160° (34 % d.T.).

EJEMPLO 2.

N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina (IV).

15. 4,74 g (0,0099 mol) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina (III) del punto de fusión 165-170° se mezclan con 11,0 ml de sosa cáustica 1-n y a 22° se agita durante 1 hora. Después de 15 minutos aproximadamente se habrá disuelto la cantidad principal. Después de otros 15-20 minutos empieza la separación de una precipitación voluminosa (sal

20. sódica de IV). La precipitación se disuelve finalmente agregando 20 ml de agua, se filtra de una huella de material sin filtrar y después se introduce CO<sub>2</sub> hasta que el pH de la solución sea 8,5.

25. La fase acuosa se lava entonces 2 veces, cada una con 80 ml de éster acético y las soluciones acéticas se lavan 1 vez con poca solución de bicarbonato sódico.

30. La fase acuosa y la solución bicarbonática de lavado se reúnen, con ácido clorhídrico 2-n se pone a pH = 1, con lo que se precipita un material amorfo. Este último se disuelve extrayendo 4 veces, cada una con



237288

- 250 ml de éster acético; las soluciones éster-acéticas se lavan 2 veces con poca solución de sulfato de sodio, se secan sobre sulfato de sodio y dan al vaporizar 4,46 g de un residuo parcialmente cristalino. Por cristalización
5. de acetonitrilo se obtienen en total 3,26 g de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina (IV) en drusas de agujas del punto de fusión 94-98° (71 % d.T.). Después de recrystalizar dos veces de acetonitrilo funden a 98-101°;  $[\alpha]_D^{25} = + 10^{\circ} \pm 4^{\circ}$  (c = 1,4 en metanol).
10. Los cristales se disuelven en metanol, dimetilofornamida, acetonitrilo caliente y agua caliente, son de difícil disolución en agua fría y acetonitrilo, éster acético, tetrahidrofurano, acetona; de fácil disolución en solución saturada de bicarbonato de sodio.
15. EJEMPLO 3.  
Ester metálico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosina (VI).
- 3,72 g (13 mmol) de éster metálico de L-valilo-L-tirosina (V) recién preparado y 5,47 g (11,8 mmol) de carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina (IV) se disuelven en 35 cm<sup>3</sup> de dimetilofornamida y se agregan
20. 2,52 g (12,3 mmol) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida. Después de 24 horas a 21° se filtra en vacío la diciclohexilurea precipitada y el filtrado se libera totalmente a 0,1 mm Hg y 45° de temperatura del baño, del dimetilofornamida. El
25. aceite residual se lava primero con petroléter, después, enfriando con hielo, con solución de bicarbonato diluido, agua, ácido clorhídrico diluido y agua, con lo que el producto, que al principio era aceitoso, se pone lentamente
30. granuloso. El producto en bruto (8,79 g) se disuelve

237288



5. y precipita para su ulterior limpieza de metanol caliente y el polvo insoluble en metanol se frota con acetona caliente. Se obtienen así 2,91 g (33 %) de éster metílico de carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosina (VI) del punto de fusión 202-206°;

$$[\alpha]_D^{23} = -42 \pm 42 \quad (c = 0,94 \text{ en dimetiloformamida}).$$

El éster metílico de L-valilo-L-tirosina (V) empleado como material inicial se prepara como se describe más adelante (ejemplo 9).

10. EJEMPLO 4.

N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosina (VII).

15. 2,58 g (2,5 mmol) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosina (VI) se disuelven en 30 cm<sup>3</sup> de dimetiloformamida y en el plazo de 15 minutos se agregan 100 cm<sup>3</sup> de sosa cáustica 1/10-n en varias porciones, teniéndose cuidado de que el pH de la solución no sobrepase 11. Después de agregar la lejía se deja durante otros 15 minutos al pH 11 después, agregando CO<sub>2</sub> sólido se pone el pH a 8 y la solución se libera primeramente del agua a 11 mm y 45°

20. de temperatura del baño y después de la dimetiloformamida a 0,1 mm. El residuo se disuelve en 30 cm<sup>3</sup> de agua, se filtra de unas huellas de copos y el filtrado claro se acidifica enfriando con ácido clorhídrico 2-n. El

25. producto viscoso precipitado se solidifica al frotar (bajo enfriamiento con hielo). El producto en bruto (2,14 g) se disuelve en metanol caliente y se precipita agregando acetonitrilo. Se obtienen 1,77 g (70 %) de

30. carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-



237288

L-tirosina (VII) en forma de polvo, punto de fusión aproximadamente 175-183° (espumando);  $[\alpha]_D^{23} = 0^{\circ} \pm 4^{\circ}$  (c = 0,4 en metanol).

EJEMPLO 5.

5. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (IX).

10. 1,88 g (2,58 mmol) de carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosina (VII) y 1,31 g (2,50 mmol) de éster metílico de L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (VIII) recién preparado se disuelven en 15 cm<sup>3</sup> de dimetiloformamida y se agrega una solución de 0,62 g (2,62 mmol) de 1-ciclohexilo-3-morfoliniletilo-carbodiimida. La solución se deja durante 21 horas

15. a 20°, a continuación se retira la dimetilformamida en alto vacío y el aceite residual se frota con agua, enfriando con hielo, con lo que se pone lentamente granuloso. El polvo se lava varias veces con agua, después con

20. solución de bicarbonato diluida y agua y se seca. El producto en bruto (3,70 g) se lava para su ulterior limpieza con acetona y metanol y da 0,68 g de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (IX), punto de fusión 190-205°;  $[\alpha]_D^{23} = -29^{\circ} \pm 4^{\circ}$  (c = 0,52 en dimetiloformamida). El producto se

25. disuelve difícilmente en disolventes orgánicos usuales con excepción de en dimetileformamida; disoluble en ácido clorhídrico muy diluido. El éster metílico de L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (VIII) se prepara como está descrito más adelante (ejemplo 15).

30.



237288

EJEMPLO 6.

Ester metílico de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina-(X).

5. 370 mg (0,3 mmol) de éster metílico de carboben-  
ciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-  
tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina  
(X) se suspenden en 15 cm<sup>3</sup> de metanol y agregando 1,0 cm<sup>3</sup>  
de ácido clorhídrico 1,24-n (4 equi.) se disuelve en  
10. metanol. Por filtración se separan unas huellas de copos  
y la solución se hidriza en presencia de 100 mg de carbón  
de palladium (10 % Pd) a temperatura de ambiente y presión  
normal (empleando un segundo recipiente de hidrización  
lleno con sosa cáustica diluída para la absorción del  
15. CO<sub>2</sub> desarrollado). La hidrización estará terminada después  
de 13 horas y recepción de algo más de la cantidad de  
hidrógeno calculada. A continuación se filtra la solución  
del catalizador y se vaporiza en vacío hasta secar. El  
resíduo (resina) pesa 310 mg (calculado para una mezcla  
20. de cantidades equimolares de trihidrocloruro y cloruro  
amónico = 360 mg). El producto (X) se sigue elaborando sin  
limpiar. Se disuelve fácilmente en agua pero es de difícil  
disolución en álcali acuoso; se disuelve en metanol, es  
insoluble en éter.

EJEMPLO 7.

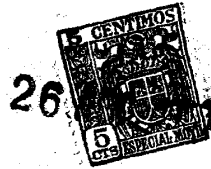
25. L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-  
L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

30. Para disolver 256 mg (25 mol) de éster metílico  
de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleu-  
cilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina en 12,0 cm<sup>3</sup> de



237288

- metanol al 66% se agregan en varias porciones sosa cáustica 0,1-n hasta que el valor pH de la solución se mantenga durante 20 minutos en 10,5-11,0 (en total 18 cm<sup>3</sup> de sosa cáustica 0,1-n agregada). Después de un total de 30 minutos se pone a pH = 8 agregando algo de CO<sub>2</sub> sólido, se retira la precipitación en forma de copos (25 mg) por filtración y el filtrado se libera del metanol en vacío. La solución acuosa (volumen 15 cm<sup>3</sup>) se mezcla con algunos cm<sup>3</sup> de solución de sosa diluida y a un pH = 9 se agita 4 veces, cada una con 100 cm<sup>3</sup> de n-butanol saturado de agua. Los extractos butanólicos se lavan una vez con 8 cm<sup>3</sup> de solución de sulfato de sodio diluida, se secan con sulfato de sodio y dan al vaporizar 195 mg de producto en bruto. Este se lava 3 veces, cada una con 5 cm<sup>3</sup> de n-butanol seco con lo que se pueden retirar 30 mg de partes de más fácil solución. La cantidad principal (135 mg) de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilo+alanina es de difícil disolución en butanol seco y se obtiene en forma de una precipitación incolora de granulación fina. El producto se disuelve en agua y metanol.
- El producto en bruto (135 mg) se somete a una distribución multiplicativa de 32 escalones (Craig-Proceso base) en el sistema n-butanol-agua. La cantidad principal (75 mg) del material activo se encuentra en las fracciones 9-21 con un máximo en la fracción 15 (G = 0,89). Las fracciones 0-8 contienen 45 mg de una impureza inactiva de traslación más lenta; las fracciones 22-32 contienen unos 20 mg de material inactivo. Una muestra de la sustancia de la fracción 15 actúa en una rata según la



237288

disposición de ensayos de Peart<sup>9</sup>) dos veces más fuerte que la noradrenalina (0,25  $\gamma$ /kg en 0,1 cm<sup>3</sup> de solución de sal común fisiológica intravenosa corresponden a 0,5  $\gamma$  noradrenalina).

5. El material de las fracciones 9-21 se reúne y se vuelve a distribuir como arriba indicado. La actividad se encuentra nuevamente en las fracciones 9-22 que en total contienen 32 mg de material (máximo en la fracción 16). Las fracciones 0-8 contienen aún 20 mg de material inactivo, las fracciones 23-32 aun unos 15 mg de material inactivo.

Una muestra de la sustancia de la fracción 16 muestra en el ensayo arriba mencionado una eficacia 5-10 veces más fuerte que la noradrenalina.

15. El material de las fracciones 9-22 se vuelve a reunir y se distribuye en el sistema n-butano-4% ácido acético en 30 escalones (Craig-Proceso base). Terminado el 30 escalón de la distribución se pone el pH de todas las fracciones a 5,5-6,0 agregando algo de solución de amoníaco metanólico, las soluciones se vaporizan a 40% y presión reducida hasta secar y los residuos de vaporización se secan, para retirar el acetato amónico, durante 8 horas a 50° y 0,01 mm Hg. Las fracciones 0-6 contienen en total 30 mg de sustancia (máximo en la fracción 1, K = 0,051); las fracciones 7-30 no contienen partes ponderables. La curva de distribución de peso experimentalmente encontrada en las fracciones 0-6 concuerda con la calculada teóricamente. Una muestra de la sustancia de la fracción 1 en el ensayo de Peart <sup>9</sup>) arriba indicado demuestra tener una eficacia 5 veces superior a la
- 20.
- 25.
- 30.



237288

- noradrenalina. La L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina así limpia se obtiene en forma de un polvo incoloro; punto de fusión (después de secar en alto vacío) 195-205<sup>o</sup> (descomp.). En el cromatograma de papel muestra en los sistemas etanol-n-butanol-H<sub>2</sub>O-dietiloamina (100:100:50:20), n-butanol-acetona-H<sub>2</sub>O-dietiloamina (100:100:50:20), etanol-n-butanol-H<sub>2</sub>O (100:100:50), n-butanol-ácido acético-H<sub>2</sub>O (100:10, con H<sub>2</sub>O) y sec.butanol-3% NH<sub>3</sub> (120:44) sobre Whatmann nº 1 los valores 0,37; 0,31; 0,18; 0,15 y 0,24. Las manchas muestran la reacción de Pauly: sobre el papel no se pueden demostrar sustancias ninhidrinopositivas.

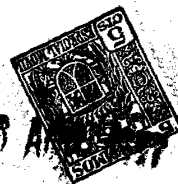
EJEMPLO 7a.

15. L-asparagilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- 5 mg de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (XI) se disuelven en 0,1 ml de HCl concent. y se deja reposar durante 100 minutos a 39<sup>o</sup>. Después se vaporiza la solución en alto vacío hasta secar, el residuo se pulveriza y se seca a 40<sup>o</sup> en alto vacío. La L-asparagilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (Hipertensina II) se puede separar del material inicial no saponificado por distribución Craig o Cromatografía en una columna de celulosa con espectros de disolvente adecuados, por ejemplo butanol-metanol-0,33 m NH<sub>4</sub>COOH (3:1:4; pH = 6,5) o sec. butanol-3% NH<sub>3</sub> (120:44). Polvo incoloro soluble en agua R<sub>f</sub> = 0,2 en el sistema sec. butanol-3% NH<sub>3</sub> (130:44).

237288

20



EJEMPLO 8.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina.

Una solución de 68,1 g (0,275 mol) de carbobenciloxi-L-valina y 50,9 g (0,261 mol) de éster metílico de L-tirosina en 1 litro de tetrahidrofurano se mezcla con 59,2 g de 1,3-diciclohexilcarbodiimida y la solución se deja reposar durante 16 horas a 21°. A continuación se filtra en vacío la diciclohexilurea precipitada (46,0 g corresp. 77 % d.t.) (punto de fusión 218-224°) y el filtrado se vaporiza hasta secar. El residuo (aceite viscoso) se frota en 300 cm<sup>3</sup> de petroléter caliente, hasta que inicie la cristalización. Los cristales se filtran en vacío y se lavan con mucho petroléter caliente. La recristalización de acetona-petroléter da en total 91 g (81%) de éster metílico de carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina (V) punto de fusión 144-147°  $[\alpha]_D^{22} = +19^{\circ} \pm 4^{\circ}$  (c = 1,06 en cloroformo).

De la solución<sup>de</sup>/petroléter, así como de la lejía madre de los cristales arriba mencionados, se obtienen en total 17 g de un producto secundario. Punto de fusión 128-130° (de petroléter). Trátase aquí de 1-(carbобензохи-L-valilo)-1,3-diciclohexilurea.

EJEMPLO 9.

Ester metílico de L-valilo-L-tirosina (V)

a) Hidrobromuro del éster metílico de L-valilo+L-tirosina: 20,0 g (0,0468 mol) de éster metílico de carbобензохи-L-valilo-L-tirosina se disuelven en 200 cm<sup>3</sup> de una solución 1,1-n de bromohidrógeno en ácido acético. Después de 1 hora a 21° se vaporiza la mezcla en vacío a 45° de temperatura del baño hasta secar y el aceite residual

26 AGO.



237228

se frota con mucho éter con lo que solidifica. El residuo se lava con éter; se obtienen 17,26 g (98%) de hidrobromuro del éster metílico de L-valilo-L-tirosina; punto de fusión 206-208°. Al recrystalizar de metanol-éter se obtienen agujas del punto de fusión 208-209°;

5.

$$[\alpha]_D = + 31^{\circ} \pm 4^{\circ} \quad (c = 1,08 \text{ en metanol}).$$

b) Ester metílico de L-valilo-L-tirosina; 5,63 g (15 mmol) del hidróbromuro obtenido bajo a) se suspenden en 80 cm<sup>3</sup> de éster acético y se agregan 2,1 cm<sup>3</sup> (15 mmol) de trietiloamina. Los cristales precipitados de trietiloaminahidrobromuro se filtran en vacío después de 10 minutos (2,68 g corresponden a 99% d.t.) y el filtrado se vaporiza hasta secar. El éster metílico de L-valilo-L-tirosina (resina 4,61 g) que queda se sigue elaborando inmediatamente como indicado en el ejemplo 3.

10.

15.

EJEMPLO 10.

Hidrocioruro del éster metílico de N-carbobenciloxi-L-isoleucilo-L-histidina.

A una solución de 44,0 g (0,26 mol) de éster metílico de L-histidina en 50 ml de acetonitrilo se agregan 55,5 g (0,27 mol) de dicitclohexil-carbodiimida disueltos en 100 ml de éster acético y 71,5 g (0,27 mol) de N-carbobenciloxi-L-isoleucina, disueltos en 700 ml de éster acético. Se inicia inmediatamente un ligero calentamiento y poco después precipitación de dicitclohexil-urea cristalina. Se enfría breve tiempo con hielo de manera que la temperatura no sobrepase más de unos + 30°. Después de algunos minutos se forma de la mezcla una masa gelatinosa que se deja reposar durante la noche a temperatura ambiente.

20.

25.

30.

237288



- La mezcla se filtra, el residuo se frota dos veces, cada una con 50 ml de éster acético, se aspira y a 90° se seca en vacío. De la mezcla de dipeptida y dicitclohexilurea así obtenida se separa la primera, con una solución de 25 ml de ácido clorhídrico conc. en 20 ml de agua y 80 ml de metanol, como hidrocioruro y el residuo se lava aún otras dos veces, cada una con 2ml de ácido clorhídrico conc. en 10 ml de agua y 20 ml de metanol. Los filtrados reunidos se vaporizan en vacío hasta secar y se cristaliza de metanol-éster acético. Se obtienen 52,6 g de hidrocioruro de dipeptida (= 44,6 % d.t.) del punto de fusión 170-172°, bajo descomposición. De las lejías madre se obtienen por ulterior vaporización y dilución con éster acético aún 39,1 g de hidrocioruro (33,1 % d.t.) del punto de fusión 160-165° (descomposición).
- 5.
- 10.
- 15.

EJEMPLO 11.

N-carbobenciloxi-L-isoleucilo-L-histidinahidrácida.

- 2,5 g (0,0053 mol) de monohidrato de hidrocioruro del éster metílico de N-carbobenciloxi-L-isoleucilo-L-histidina se hierven al reflujo en 10 ml de metanol abs. con 1,5 ml de hidrato hidrácínico durante 1 hora. El disolvente se vaporiza todo lo posible en vacío y el residuo de vaporización se mezcla con 100 ml de agua de hielo. La precipitación, al principio aceitosa, cristaliza después de reposar poco tiempo a 0°. Se filtra la carbobenciloxi-dipeptida-hidrácida, se lava con mucha agua y se seca en vacío sobre pentóxido de fósforo y ácido sulfúrico. El rendimiento en bruto es de 1,82 g (83%), recristalizando una vez de agua hirviendo se
- 20.
- 25.
- 30.

237288

26 AGO 1957



obtienen 1,6 g de producto de análisis puro; F = 186-187°;  
 $[\alpha]_D^{20} = -51^\circ \pm 4^\circ$  (c = 1,327 en ácido clorhídrico 1-n)  
 $= -22^\circ \pm 4^\circ$  (c = 0,558 en metanol).

5. La hidracida se disuelve fácilmente en metanol, etanol, acetona, éster acético y ácido clorhídrico 1-n, es de difícil disolución en agua caliente y no se disuelve en benzol, éter y petroléter.

EJEMPLO 12.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-prolilo-L-fenilalanina.

10. Para disolver 1 g (0,004 mol) de N-carbobenciloxi-L-prolina cristalina en 15 ml de tetrahidrofurano absoluto se agregan a -10° 0,61 ml (0,0044 mol) de trietiloamina y después de 5 minutos, a la misma temperatura, 0,42 ml (0,0044 mol) de éster etílico de ácido cloro-fórmico.

15. El hidrocioruro trietiloamínico se precipita inmediatamente en forma de cristales blancos.

20. La solución simultáneamente preparada y filtrada del trietiloamina-hidrocioruro del éster metílico de L-fenilalanina, de 1,1 g (0,0051 mol) de hidrocioruro de éster metílico de fenilalanina y 0,71 ml (0,0055 mol) de trietiloamina se enfría asimismo a -10° y se agrega a la solución del anhídrido mezclado. Después de reposar 2 horas a temperatura ambiente se filtra de la precipitación y el disolvente se vaporiza en vacío a 40-45°. El residuo claro como el agua se recibe en éster acético, se lava
25. 4 veces, cada una con 5 ml de solución HCl 1-n, 2 veces con agua, 4 veces cada una con 2 ml de solución de sodio-hidrógeno de carbonato 2-n y finalmente neutral con agua.

30. La solución éster acética deja, después de vaporizar y secar, 1,8 g de un aceite amarillo que aún contiene poco



237288

disolvente. El éster metílico de carbobenciloxi-L-prolilo-L-fenilalanina en bruto se descarbobenciliza inmediatamente a éster metílico de L-prolilo-L-fenilalanina.

EJEMPLO 13.

5. Ester metílico de L-prolilo-L-fenilalanina.

2,46 g (0,006 mol) de éster metílico de carbobenciloxi-L-prolilo-L-fenilalanina se disuelven en 40 ml de metanol, se mezclan con ácido clorhídrico metanólico 6-equivalente y 0,6 g de carbón de paladio (10 % Pd) y se hidriza a temperatura de ambiente y presión normal

10. (el CO<sub>2</sub> formado absorbido en NaOH). Después de recoger algo más de la cantidad de hidrógeno calculada se para la hidrización. La solución filtrada del catalizador se vaporiza en vacío y el residuo se recibe en poca

15. acetona. Al agregar éter se precipita en forma cristalina el hidrocioruro del éster metílico de la L-prolilo-L-fenilalanina; rendimiento 1,62 g (86 %). Después de recrystalizar dos veces de acetona-éter funde la sustancia a 157-158°  $[\alpha]_D^{23} = -41^{\circ} \pm 1^{\circ}$  (c = 4,15 en H<sub>2</sub>O).

20. Para la transformación en éster libre se cubre una solución de 1,10 g (0,0035 mol) del hidrocioruro en 1 ml de agua con éster acético y a 0° agitando bien se mezcla con solución de carbonato potásico saturada.

25. El extracto éster acético se seca, se vaporiza en vacío y el residuo se seca a 0,1 mm Hg. El éster metílico de L-prolilo-L-fenilalanina (0,98 g) obtenido es un aceite de fácil solución en agua y éter directamente adecuado para ulteriores reacciones.

EJEMPLO 14.

30. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-isoleucilo-L-histidilo

26 AG

237288



-L-prolilo-L-fenilalanina.

5. La solución de 1,49 g (0,035 mol) de N-carbo-benciloxi-L-isoleucilo-L-histidinahidrácida (ejemplo 11) en 15 ml de ácido clorhídrico 1-n se extrae una vez con poco éster acético, la fase éster-acética se lava nuevamente con 3 ml de ácido clorhídrico 1-n y las soluciones ácido clorhídricas reunidas se cubren en el embudo separador con éster acético y se enfría con hielo a 0°. A continuación se gotean lentamente 275 mg (0,004 mol) de nitrito de sodio en 5 ml de agua de hielo, se deja reaccionar durante 3 minutos y la solución de acida ácido-clorhídrica se pone fenolftaleína-alcalina con 3 ml de solución de carbonato potásico saturada. La solución acuosa se extrae otras dos veces enfriando con hielo con mucho éster acético y la fase orgánica se lava neutral con mucha agua.

10. La solución de acida fría como el hielo, secada sobre sulfato de sodio, se filtra en una solución de éster metílico de L-prolilo-L-fenilalanina recién preparada, enfriada a 0° y liberada del hidrocioruro de trietiloamina, que se obtuvo de 1,24 g (0,004 mol) de hidrocioruro de éster metílico de L-prolilo-L-fenilalanina y 0,55 ml (0,004 mol) de trietiloamina en 15 ml de éster acético absoluto.

15. Se deja reaccionar durante 18 horas a 0-5° y dos horas a temperatura ambiente, se vaporiza el disolvente a 40° en vacío hasta la mitad y se lava con ácido clorhídrico 1-n, solución de sosa 2-n fría como el hielo y con agua neutral; se seca sobre sulfato de sodio y el éster acético se vaporiza en vacío.

30.

237288<sup>26</sup> AGO.



5. El rendimiento es de 2 g (85 %) de éster tetrapeptídico de carbobenciloxi amorfo amarillento. La distribución de 36 escalones, entre metanol al 80% y cloroformo:tetraclorocarbono = 1:1:1 dá 1,6 g de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina. La fracción de análisis muestra, después de disolver y precipitar una vez de metanol-agua, el punto de fusión 105-110°;  $[\alpha]_D^{22} = -56 \pm 4$  (c = 0,971 en metanol).

10. El éster tetrapeptídico de N-carbobenciloxi se disuelve bien en la mayoría de los disolventes orgánicos a excepción de éter y petroléter.

EJEMPLO 15.

Ester metílico de L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

15. a) Dihidrobromuro: 1,72 g (2,61 mmol) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se mezclan con 8,3 cm<sup>3</sup> de bromohidrógeno 1,1-n en ácido acético, iniciándose así pronto la solución. Después de reposar durante 2 horas a 21° se destila totalmente el ácido acético a 0,1 mm Hg y 25° y la resina residual se frota con éter, con lo que ésta se granula. El dihidrobromuro del éster metílico de la L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina en bruto pesa 1,79 g. Punto de fusión 130-140°.

25. b) Ester libre: 1,96 g (2,85 mmol) de dihidrobromuro del éster metílico de la L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se disuelve en poca agua, se retira un ligero enturbiamiento lavando con algo de éster acético, la solución acuosa se mezcla con 50 cm<sup>3</sup> de

30.

237288

26



- cloroformo y enfriando con hielo se agrega solución de potasio saturada hasta que el pH de la fase acuosa sea 10. El éster precipitado se disuelve al cambiar limpiamente en la fase clorofórmica. La solución clorofórmica se lava una vez con poca solución de sulfato de sodio saturada; la solución potásica y sulfato-sódica se lavan ulteriormente con otros 30 cm<sup>3</sup> de cloroformo. Las soluciones clorofórmicas dejan, después de secar con sulfato de sodio y vaporizar, 1,31 g de éster metílico de
5. L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (VIII) como resina, que inmediatamente se sigue elaborando. (Véase el ejemplo 5). Rendimiento 88 %.

EJEMPLO 16.

20. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- Una solución de 467 mg (1 mmol) de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina y 272 mg (0,35 mmol) de éster metílico de L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina en 2,5 ml de dimetilofor-  
20. mada se mezcla con 237 mg (1 mmol) de 1-ciclohexilo-3-morfoliniletilecarbodiimida. Después de reposar durante 24 horas a temperatura de ambiente se libera la solución a 0,1 mm Hg y 35°, del dimetilofor-  
25. mada. El residuo se frota con agua de hielo y el material sólido precipitado se lava con agua y se seca en vacío a 30°. El producto en bruto se frota con acetona, después se extrae con acetona hirviendo y finalmente se lava con metanol frío como el hielo. El material así limpio (289 mg 67 %) es  
30. un polvo ligeramente amarillento del F. = 207-210°. Para

26 AGO



237288

la ulterior limpieza se distribuye la substancia en contracorriente entre n-butanol y ácido acético 0,1 % sobre 30 escalones (K = 4,17). Las fracciones 23-28 dan 132 mg de producto puro y las fracciones 17-22 que

5. contienen un producto secundario (74 mg) después de volver a distribuir otros 34 mg de material puro; total 166 mg (39%). Después de disolver y precipitar dos veces de metanol funde la substancia a 214-216°;  $[\alpha]_D^{23} = -27^{\circ} \pm 2^{\circ}$  (c = 2,22 en dimetiloformamida).

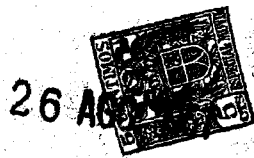
10. El éster metílico de L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina empleado como material inicial se obtiene como se indica más adelante (ejemplo 19 y siguientes).

EJEMPLO 17.

15. Ester metílico de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

20. 85 mg (0,07 mmol) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se suspenden en 10 ml de metanol, se disuelven agregando ácido clorhídrico metanólico 0,3 m equivalente y en presencia de 0,3 g de carbón de paladio (10 % Pd) se agita a temperatura ambiente y presión normal durante 15 horas en una atmósfera de hidrógeno.

25. La solución neutral se filtra del catalizador y se vaporiza en vacío. El producto de reacción semi-sólido se lava con acetona y da, después de disolver y precipitar de metanol-éter, 51 mg (63 %) de trihidrocloruro del éster metílico de la octapeptida.

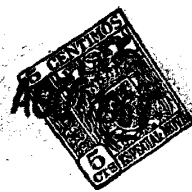


237288

EJEMPLO 18

L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- a) 48 mg (0,042 mmol) de trihidrocloruro de éster metílico de la L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se suspenden en 0,5 ml de metanol y en el plazo de 1 hora se mezcla lentamente con 0,3 ml de sosa cáustica 1-n (aprox. 7 equivalentes), demanara que la solución muestra siempre un valor pH entre 10,5 y 11,5. Después de otros 30 minutos se libera la solución, en vacío a temperatura de ambiente, del metanol, con ácido acético 1-n se pone el pH a 7,4 y se liofiliza. La mezcla de peptida libre y sales inorgánicas (79 mg), que se obtiene como residuo, se fracciona por distribución de contracorriente en el sistema Butanol/Hidróxido de amonio 0,1-n. La octapeptida pura se obtiene en forma de polvo incoloro que es soluble en agua y metanol, de difícil disolución en etanol e insoluble en acetona.
- b) 400 mg de éster metílico de octapeptida en bruto (que contiene unos 3 mol de HCl + 1 mol NH<sub>4</sub>Cl) se disuelven en 4 ml de metanol (solución clara marrón-amarilla) y después de agregar 8 ml de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1-n en H<sub>2</sub>O se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, la solución que contiene pocos copos marrones como sedimento en el fondo, se neutraliza con HCl 4-n a pH = 6, se enfría con acetona-CO<sub>2</sub> y en alto vacío se liofiliza durante la noche. Se obtienen así 930 mg de un polvo marrón que además de la peptida contiene unos 590 mg de KCl.



237288

La cantidad total se distribuye sobre 30 escalones en el sistema n-butanol-0,33 m NH<sub>4</sub> COOH (formiato de amonio) en H<sub>2</sub>O (pH 6,5). Volumen de fase c.u. 10 ml.

5. La octapeptida libre muestra  $G = 0,17$  y se aísla de los contenidos de los tubitos reunidos mediante triple extracción con 400 ml cada vez de mezcla butanol-metanol (3:1) y lavado doble de la solución orgánica con cada vez 30 ml de NH<sub>4</sub>COOH al 5% (formiato de amonio) en H<sub>2</sub>O. Después de vaporizar a 45° (11 mm Hg) y secar en alto vacío (8 horas a 40°) se obtiene en total 190 mg de un polvo blanco de fácil solución en agua, que en el ensayo biológico en la rata desrionada tiene un efecto 20 veces mayor que la noradrenalina.
- 10.
15. En el cromatograma de papel la substancia se muestra unitaria, con un valor  $R_f = 0,19$  en el sistema sec. butanol-NH<sub>3</sub> al 3% (120:44).  
Como segunda fracción se obtiene en la distribución de los tubitos 18-30 ( $G = 42$ ) aun 140 mg de material inicial sin saponificar (-octapeptida-éster metílico). Valor  $R_f$  en el sistema arriba mencionado = 0,30.  
c) 500 mg de éster metílico de octapeptida (igual material inicial que en a) se disuelven en 2 ml de HCl conc. y se dejan reposar durante 100 minutos a 39°. Después se vaporiza la solución en vacío hasta secar, el residuo se pulveriza finamente y nuevamente se seca en alto vacío durante algunas horas a 40°. Se obtienen así 510 mg de un producto en bruto de color marrón claro, que en la rata desrionada ya muestra 20 veces mayor efecto que la noradrenalina.
- 20.
- 25.
- 30.

237288

264



5. Para su limpieza se disuelven 300 mg del mismo en 2 ml de agua, se neutraliza con NaOH 2-n a pH 6 y se distribuye sobre 30 fases en el sistema n-butanol-metanol-0,33 m  $\text{NH}_4\text{COOH}$  -3:1:4 (pH 6,5) con cada vez 10 ml de volumen de fase. De los tubitos 5-14 se pueden obtener por elaboración como bajo a) 170 mg de hidrolizado en forma de sustancia incolora soluble en agua que en la rata desrionada muestra ser 20 a 25 más activa que la noradrenalina. En el
10. cromatograma de papel se forma, en el sistema butanol sec.- $\text{NH}_3$  3% (120:44), una disociación de los dos compuestos con los valores  $R_f$  0,13 y 0,19. La segunda mancha muestra la mayor intensidad de color con ninhidrina.

15. El compuesto con el valor  $R_f$  0,13 es la L-asparagilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina, mientras que en el compuesto con el valor  $R_f$  0,19 se trata de la octapeptida con el resto asparagínico.

20. Los tubitos 15-19 de la distribución Craig contienen 55 mg de fracción mixta mientras que de los tubitos 20-29 se pueden regenerar 22 mg de material inicial. ( $R_f = 0,30$ ).

25. Además de en la distribución Craig sobre muchos escalones, se pueden separar ambos productos de hidrolisis (compuestos asparagínico y asparagílico) también totalmente por cromatografía en una columna de polvo de papel con sistemas de disolventes adecuados, por ejemplo BuOH-MeOH- $\text{NH}_4\text{COOH}$ .

EjemPlo 19.

30. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-

237288

26 A



valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- 1,95 g (0,003 mol) de carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidina se suspenden en 10 ml de dimetiloformamida y se mezclan con 0,83 g (0,003 mol) de éster metílico de L-prolilo-L-fenilalanina y 0,84 g (0,0035 mol) de 1-ciclohexilo-3-morfolinilo-etilcarbodiimida. Después de 1 hora se ha disuelto totalmente el material inicial. La solución de reacción se deja reposar durante la noche a temperatura ambiente, después a 0,1 mm Hg, se libera de la dimetiloformamida y el residuo se mezcla con agua de hielo. El material sólido precipitado se lava dos veces con ácido clorhídrico 2-n (con lo que el producto de reacción forma un hidrocloreuro que es soluble en agua pero no en ácido clorhídrico 2-n), por tratamiento con solución de carbonato potásico se vuelve a transformar en la forma básica, se lava varias veces con agua y se seca en vacío a 35°. El producto en bruto obtenido (2,40 g) se recibe en 100 ml de acetona, se filtra del material insoluble (0,30 g) y se vaporiza en vacío. El residuo dá, después de frotar con éster acético, 1,57 g (58 %) de material sólido del F. = 151-156°.
- 1 g de esta substancia se distribuye, para su ulterior limpieza por distribución en contracorriente, en el sistema metanol-agua 4:1 / cloroformo-tetraclorocarbono 1:1 a través de 48 escalones. La cantidad principal del material (0,84 g) se encuentra en las fracciones 15-28 con un máximo en peso en la fracción 21 (K = 0,78). Estas fracciones dán, después de disolver y precipitar de acetona, 0,66 g de material amorfo del F. = 158-162°.
- Después de volver a disolver y precipitar de mucha acetona

26 AGO.



237288

muestra la substancia el F. = 161-163° y  $[\alpha]_D^{24} = - 56° \pm 2°$  (c = 1,38 en etanol).

La carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidina empleada como material inicial se obtiene como se indica más adelante (ejemplos 21/22).

5.

EJEMPLO 20.

Ester metílico de L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- 10. 635 mg (0,7 mmol) de éster metílico de carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se frota con 1 ml de ácido acético glacial hasta que forme una solución unitaria y se mezcla con 1,9 ml de bromohidrógeno 1,6-n (3 mmol) en ácido acético glacial. Al reposar a temperatura ambiente
- 15. empieza a separarse el producto de reacción, después de 10 minutos, en forma de aceite. La mezcla se agita durante 2,5 horas y a continuación se vaporiza totalmente a 0,1 mm Hg y 30°. El residuo dá, después de lavado con éter y acetona, 648 mg de di-hidrobromuro del éster
- 20. metílico de la hexapeptida en forma de polvo casi incoloro.

- 25. Para su transformación en el éster libre se pone una solución de 562 mg (0,6 mmol) de esta substancia en 2 ml de agua a 0° fuertemente alcalina con solución de carbonato potásico y se extrae 4 veces cada una con 20 ml de cloroformo frío. Los extractos clorofórmicos se lavan con poca agua, se secan y se vaporizan en vacío. El residuo aceitoso dá, al frotar con éter, 272 mg (59%) de peptida en forma de polvo ligeramente amarillo,
- 30. que se sigue reaccionando directamente.

237288

26 AGO



EJEMPLO 21.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidina.

5. Una solución de 9,94 g (0,024 mol) de carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina en 100 ml de acetonitrilo se mezcla con 6,64 g (0,28 mol) de 1-ciclohexilo-3-morfolinilo-etilo-carbodiimida y a continuación con 6,5 g (0,024 mol) de éster metílico de L-valilo-L-histidina. Después de 15 horas se filtra el producto de reacción precipitado y se lava con acetonitrilo. El producto en bruto (11,2 g = 70 %) del F. = 208-211<sup>o</sup> se disuelve en 500 ml de metanol caliente, la solución se estrecha a 100 ml y se mezcla con el mismo volumen de éter. El éster metílico de carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidina puro funde a 222-224<sup>o</sup>. Después de la repartición en contracorriente en el sistema metanol-agua 4:1 / cloroformo-tetraclorocarbono 1:1 muestra la sustancia el punto de fusión 224-226<sup>o</sup> y  $[\alpha]_D^{24} = -31^{\circ} \pm 2^{\circ}$  (c = 2,09 en ácido acético glacial).
- 10.
- 15.
20. La N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina empleada como material inicial se obtiene según los ejemplos 23/24 y el éster metílico de L-valilo-L-histidina según los ejemplos 25/26.

EJEMPLO 22.

25. N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidina.

30. Una suspensión de 3,32 g (0,005 mol) de éster metílico de carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidina en 30 ml de metanol se mezcla a unos 10<sup>o</sup> con 15 ml de sosa cáustica 1-n, con lo que el material inicial se disuelve rápidamente. La solución de reacción



237288

- se deja reposar durante dos horas a temperatura ambiente, a continuación se libera en vacío del metanol y -después de separar algunos copos por filtración- se acidifica con 20 ml de ácido acético 2-n. El material gelatinoso
5. precipitado se centrifuga, se suspende varias veces en agua y de nuevo se centrifuga y finalmente se lava con acetona y metanol y se seca en vacío a 40°. La carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidina se obtiene en un rendimiento de 2,74 g (84 %) y funde,
10. después de lavar con metanol hirviendo, a 236-238°  $[\alpha]_D^{23} = -10^{\circ} \pm 2^{\circ}$  (c = 2,10 en ácido acético glacial). La sustancia es insoluble en todos los disolventes orgánicos usuales, excepto en dimetilformamida y ácido acético glacial.
15. EJEMPLO 23.  
Ester etílico de N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina.
- Una solución de 50,2 g (0,2 mol) de carbobenciloxi-L-valina y 41,8 g (0,2 mol) de éster etílico de L-tirosina en 400 ml de acetonitrilo se mezcla con
20. 45,3 g (0,22 mol) de 1,3-di-ciclohexilo-carbodiimida y se deja reposar durante 5 horas a temperatura ambiente. La mezcla de Di-ciclohexilo-urea y el producto de reacción precipitada se filtra y el derivado dipeptídico se extrae de esta mezcla con éster acético. La solución
25. de reacción original se vaporiza en vacío, el residuo se disuelve en éster acético, la solución se lava con ácido clorhídrico 2-n, solución de hidrogenocarbonato de sodio 2-n y agua, se seca y se reúne con la solución éster-acética del producto de reacción originalmente
30. precipitado. El residuo que se obtiene al vaporizar

237288 AG



en vacío cristaliza al agregar éter y suministra 74,5 g (84 %) de éster etílico de carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina del F. = 142-145°. Recristalizando de acetona-éter se obtienen 68,6 g de material puro del F. = 148-149°;

5.  $[\alpha]_D^{24} = + 33^\circ \pm 1^\circ$  (c = 3,96 en cloroformo).

EJEMPLO 24.

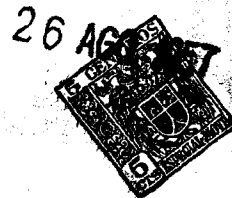
N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina.

70,7 g (0,16 mol) de éster etílico de carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina se disuelven en 300 ml de metanol y agitando se mezcla, en el plazo de 15 minutos a unos 10°, con 400 ml de sosa cáustica 1-n. La solución de reacción clara se deja reposar durante 2 horas a temperatura ambiente, después se libera en vacío del metanol y se filtra el poco material sólido. Al acidificar el filtrado con ácido clorhídrico diluido se precipita la carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina en forma cristalina y se filtra, se lava con agua y se seca en vacío a 50°; F. = 161-163°.  $[\alpha]_D^{22} = + 26^\circ \pm 1^\circ$  (c = 4,01 en piridina). El rendimiento es de 64,01 g (97 %).

20. EJEMPLO 25.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-valilo-L-histidina.

Una solución de 25,1 g (0,1 mol) de carbobenciloxi-L-valina y 16,7 g (0,1 mol) de éster metílico de L-histidina en 100 ml de acetonitrilo se mezclan a unos 10° con 26,1 g de 1-ciclohexilo-3-morfoliniloetilo-carbodiimida (0,11 mol) y se deja reposar a temperatura de ambiente. Después de aproximadamente 1 hora empieza la separación de un producto gelatinoso que, después de 15 horas, se filtra y se lava con acetonitrilo: 30,8 g



237288

(77 %); F. = 152-156°. El éster metílico de N-carbobenciloxi-L-valilo-L-histidina recristalizado de acetona-éter funde a 161-163°;  $[\alpha]_D^{23} = -22^\circ \pm 2^\circ$  (c = 2,04 en etanol).

5. EJEMPLO 26.

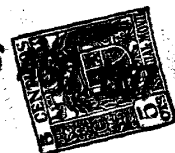
Ester metílico de L-valilo-L-histidina.

- 10 g (0,025 mol) de éster metílico de carboben-  
ciloxi-L-valilo-L-histidina se disuelven en 100 ml de  
metanol, se mezcla con una solución de 0,03 mol de gas  
10. de ácido clorhídrico en metanol y en presencia de 2 g  
de carbón de paladio (10 % Pd) se hidriza a temperatura  
de ambiente y bajo presión normal (el CO<sub>2</sub> formado absorbido  
simultáneamente en sosa caustica). Después de recibir  
la cantidad calculada de hidrógeno se para la hidrización  
15. después de 1 hora. El catalizador se filtra y la solu-  
ción de reacción se filtra en vacío: El hidrocioruro  
de la base que se obtiene en forma de aceite (8,7 g) se  
disuelve en poca agua y después de cubrir la capa de la  
solución con éster acético, agitando a O<sub>2</sub>, se pone  
20. fuertemente alcalina con solución de potasio saturada.  
La fase éster acética que contiene el producto de reacción  
se seca y vaporiza en vacío y el residuo aceitoso que  
contiene el éster metílico de L-valilo-L-histidina  
(6,5 g) se sigue reaccionando directamente.

25. EJEMPLO 27.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-aspara-  
ginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-  
L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- 760 mg (0,96 mmol) de éster metílico de L-valilo-  
30. L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina



237288

y 1,35 g (2,88 mmol) de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina en 10 ml de dimetilformamida se mezclan con 690 mg (2,9 mmol) de 1-ciclohexilo-3-(morfoliniloetilo)-carbodiimida y se deja reaccionar durante 2 días a temperatura de ambiente. A continuación se retira la dimetilformamida en alto vacío y el aceite residual se frota 5 veces, cada una con 5 ml de agua, enfriando con hielo, con lo que éste se pone parcialmente coposo.

5. El producto en bruto, 2,4 g se lava, para su ulterior limpieza, repetidas veces con mucha acetona fría como el hielo y metanol y dá 250 mg de éster carbobenciloxi-octapeptídico. De los extractos acetónicos y metanólicos se obtienen otros 180 mg de éster carbobenciloxi-octapeptídico.

10. El éster metílico de carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina en bruto (430 mg) tiene el punto de fusión 175-190° y se emplea directamente para la ulterior elaboración.

15. El éster metílico de L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina empleado como material inicial se puede obtener como descrito mas adelante (Ejemplos 30-31).

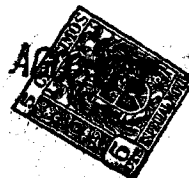
EJEMPLO 28:

20. Ester metílico de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

25. 410 mg (0,33 mmol) de éster metílico de carbobenciloxi-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina

30.

26



237288

- se suspenden en 10 ml de metanol y agregando 1 ml de ácido clorhídrico 1,39-n (4 equivalentes) se disuelven. Se filtran las impurezas en forma de copos y la solución se hidriza en presencia de 250 mg de carbón Pd (10 % Pd) bajo condiciones normales. (El CO<sub>2</sub> formado se absorbe en un 2º recipiente de hidrización con sosa caústica diluida).
5. Despues de 4  $\frac{1}{2}$  horas y recibida algo mas de la cantidad de hidrógeno calculada está terminada la hidrización. Se filtra el catalizador y la solución se vaporiza hasta secar en vacío a 40º. Se obtienen 360 mg de resina (406 mg calculados para trihidrocloruro y la cantidad equimolar de cloruro amónico.)
- 10.

El producto se sigue elaborando sin ulterior limpieza. Se disuelve bien en agua y metanol.

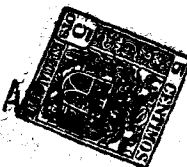
15. EJEMPLO 29.

L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- 360 mg de trihidrocloruro del éster de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo
- 20 -L-prolilo-L-fenilalanina se disuelven en 10 ml de metanol al 66 % y en porciones se mezcla con sosa caústica 1/10-n de manera que el valor pH de la solución se mantenga durante 20 minutos en 10,5-11 (Consumo total en NaOH 1/10-n = 18,5 ml). A continuación se pone la solución
25. con CO<sub>2</sub> sólido a un pH de 7-8 y se filtra de las impurezas precipitadas (10-20 mg), se vaporiza todo lo posible el metanol en vacío a 35º y con solución de sosa 2-n se pone la solución a pH 9.

- La solución acuosa se extrae 4 veces, cada una
30. con 100 ml de n-butanol saturado de agua, los extractos

237288<sup>26 A</sup>



- butanólicos se lavan 1 vez con 10 ml de solución de sulfato de sodio y se seca sobre sulfato de sodio. El residuo de vaporización se lava 3 veces, cada una con 3 ml de butanol seco, con lo que se pueden separar 50 mg
5. de partículas de fácil solución.
- Se obtienen 190 mg de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina en forma de polvo fino ligeramente gris que se disuelve bien en agua y metanol.
10. Una prueba del producto en bruto en la rata muestra el mismo efecto que la noradrenalina.
- EJEMPLO 30.
- L-asparagilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.
15. 2,08 g (1,75 mmol) de trihidrocloruro de éster metílico de L-asparaginilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina, disueltos y precipitados una vez de metanol/acetona (vease ejemplo 28), se calientan en HCl concentrado durante 85 minutos
20. a 37°. Después de unos 10-15 minutos se forma una solución clara. El ácido clorhídrico se vaporiza rápidamente bajo presión reducida a 25° y el residuo se seca sobre hidróxido de potasio y pentóxido de fósforo en alto vacío.
25. El rendimiento es de 2 g de trihidrocloruro de L-asparagilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina que aún contiene impurezas de cloruro amónico.
30. 1,26 g del producto en bruto se disuelven en 20 ml de etanol y la peptida se vuelve a precipitar con .

237288



120 ml de acetona. Dos posteriores soluciones y precipitaciones dan 1,08 g de trihidrocloruro de octapeptida blanco y granuloso. En el ensayo animal muestra el producto sin precipitar la misma actividad como la noradrenalina

5. (Ensayo seg. Peart) y doble eficacia en la rata desriñonada.

Una prueba (200 mg) del trihidrocloruro de la L-asparagilo-L-arginilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se distribuye según

10. Craig a través de 30 escalones entre n-butanol y 0,3 cm<sup>3</sup> de acetato amónico 1:1 (pH = 6,5-7): G=0,67. Las soluciones se vaporizan en vacío a 40° y el acetato amónico se sublima en alto vacío a 40° durante 30 minutos.

Las fracciones 7-16 (máximo en fracción 12)

15. muestran en el ensayo Peart la misma actividad como el producto sin distribuir.

Las determinaciones de amoníaco y nitrógeno total muestran que la asparagina durante la saponificación ácida principalmente se saponificó a ácido asparagínico. Pruebas de halógeno cualitativas muestran que

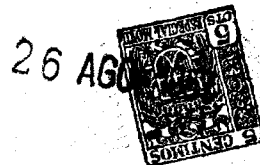
20. la octapeptida está presente como mono- o dihidrocloruro.

EjemPlo 31.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

25. La solución de 2,1 g (0,005 mol) de N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosina en 10 ml de acetonitrilo seco se mezcla con 1,16 g (5% exceso) de dicitclohexilo-carbo-diimida y la solución de 2,68 g (0,005 mol) de éster metílico de L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina

30. en 10 ml de acetonitrilo. Se precipita momentaneamente



237288

- la dicitclohexilurea. Después de 5 horas empieza la separación del éster N-carbobenciloxi-hexapeptídico en forma de masa gelatinosa. Se deja reposar durante 20 horas a temperatura de ambiente y a continuación se vaporiza el acetonitrilo a 40° bajo presión reducida.
5. El residuo de vaporización se digiere con 10 ml de metanol frío como el hielo y se lava otras 5 veces cada una con 1 ml de metanol enfriado. El metanol se vaporiza en vacío y el residuo en cloroformo se lava 3 veces con ácido clorhídrico 2-n (5 y 2 veces 2 ml), 5 veces, cada una con 2 ml de solución de bicarbonato de sodio frío como el hielo y neutral con agua,. La solución secada sobre sulfato de sodio se estrecha a la mitad y se hierve una vez brevemente con carbón activo.
10. La vaporización total del disolvente da 4,2 g de éster N-carbobenciloxi-hexapeptídico que aún está algo impuro con poca dicitclohexilurea. El éster carbobenzoxi se disuelve en poca acetona fría, se filtra de la restante dicitclohexilurea y se precipita nuevamente con mucho éter.
15. Se obtienen 3,7 g (79 %) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.
20. El preparado de análisis muestra, después de otras dos limpiezas de acetona-éter el F. = 142-147°/149°  $[\alpha]_D^{24} = -60^{\circ} \pm 4^{\circ}$  (c = 1,291 en metanol).
25. El éster metílico de L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se puede obtener como más adelante se indica (ejemplo 32).



237288

EJEMPLO 32.

Ester metílico de L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- A 970 mg ( $\sim 0,001$  mol) de éster metílico de
5. N-carbobenciloxi-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se agregan 6 ml de una solución aprox. 2-n de bromohidrógeno en ácido acético glacial. Se apela-tona la substancia a una masa pegajosa. Después de agitar durante 1 hora en un agitador magnético se
10. forma una solución clara; se deja reaccionar aun durante otra hora a temperatura de ambiente, a continuación se vaporiza el ácido acético glacial en vacío a 40° y el residuo se frota 2 veces con éter abs. El dihidrobromuro granuloso del éster L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se disuelve en 10 ml
15. de agua, se extrae la solución acuosa una vez con poco éster acético, la fase éter-acética se lava aun una vez con 2 ml de agua y las soluciones acuosas reunidas se liberan en vacío del éster acético disuelto. Con
20. solución de bicarbonato de sodio se pone la solución enfriada a pH 8, se filtra del éster hexapeptídico precipitado y lava neutral con agua de hielo. El producto secado (730 mg = 89%) muestra el F. = 130-140° y se puede limpiar de cloroformo/éter.  $[\alpha]_D^{24} = -53^{\circ} \pm 4^{\circ}$
25. (c = 0,636 en metanol).

EJEMPLO 33.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- La solución de 6,6, g (0,0158 mol) de hidracida
30. de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-histidina (obtenida según



237288

- ejemplo 34) en 50 ml de ácido clorhídrico 1-n se extrae una vez con poco éster acético, la solución éster acética se lava nuevamente con 5 ml de ácido clorhídrico 1-n y las soluciones ácido clorhídricas reunidas se cubren con éster acético fresco y se enfría a 0°. A continuación se mezcla lentamente con una solución enfriada a 0° de 1,14 g (0,0165 mol) de nitrito de sodio en 5 ml de agua, se deja durante 5 minutos y la solución ácida
5. ácido-clorhídrica se pone fenolftaleína-alcalina con 9 ml de solución de carbonato sódico saturada. La fase acuosa se vuelve a extraer otras dos veces, enfriando con hielo, con mucho éster acético, después se lavan las soluciones éster-acéticas neutral con agua y se seca sobre sulfato de sodio.
10. De 5 g (0,016 mol) de hidrocloreuro de éster metílico de L-prolilo-L-fenilalanina, suspendidos en 50 ml de éster acético seco se obtiene, agregando 2,25 ml (0,0162 mol) de trietiloamina, la solución del éster metílico de la L-prolilo-L-fenilalanina libre. Esta solución se enfría a 0° y se mezcla con la solución ácida preparada según se indica más arriba.
15. Después de reposar durante 18 horas a 0-5° y dos horas a temperatura de ambiente se vaporiza en vacío a 40° 1/3 del disolvente, se lava con ácido clorhídrico 1-n, solución de sosa 2-n fría como el hielo y neutral con agua. Los extractos ácido clorhídricos, sódicos y acuosos se vuelven a lavar en otros dos embudos separadores con mucho éster acético.
20. Después de vaporizar el éster acético se
25. obtienen 9,17 g (87 %) de éster metílico de N-carbobencil-
- 30.

237288



oxi-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina en forma de polvo amorfo.

5. La distribución multiplicativa según Craig en 36 escalones de 1,32 g de éster carbobenciloxi-tetrapeptídico entre metanol al 80% y cloroformo:tetraclorocarbono (1:1) dá 1,2 g de producto puro. La fracción de análisis muestra después de recristalizar y precipitar una vez de metanol-agua el F. = 110-115°  $[\alpha]_D^{24} = -57 \pm 4^\circ$  (c = 1,031 en metanol).
10. El éster metílico de la N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se disuelve bien en alcohol, metanol, acetona, éster acético y el ácido clorhídrico totalmente diluido; es por el contrario insoluble en petroléter y éter.
15. EJEMPLO 34.  
Ester metílico de L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.  
3,4 g (0,005 mol) de éster metílico de carbobenciloxi-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina en 30 ml de metanol absoluto se hidrizan agregando 2 equivalentes de ácido clorhídrico metanólico en presencia de 600 mg de carbón de palladio (10 % Pd) a temperatura de ambiente hasta su cese. Después de 1 3/4 de hora se habrá recibido poco más de la cantidad calculada. Se filtra el catalizador y la solución se vaporiza en vacío a 40°. El residuo se disuelve en 5 ml de agua fría como el hielo, se cubre con 50 ml de cloroformo enfriado y se pone fenolftaleino-alcalino con solución de carbonato potásico saturado. La solución acuosa se extrae otras dos veces, cada una con 20 ml
- 20.
- 25.
- 30.



237288

de cloroformo, las fases orgánicas se lavan con solución de sulfato de sodio concentrado y se secan sobre sulfato de sodio. Después de vaporizar el disolvente quedan 2,68 g de éster tetrapeptídico amorfo que se emplean directamente para la ulterior reacción.

5.

EJEMPLO 35.

Hidracida de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-histidina.

10 g (0,024 mol) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-histidina (obtenida según el ejemplo 36), disueltos en 40 ml de etanol abs. se mezclan con 3 ml de hidrato de hidracina y se deja reaccionar durante 2 días a temperatura de ambiente. El disolvente se vaporiza en vacío a 40° y el residuo se frota con 100 ml de agua. Después de reposar durante 3 horas a 0° se filtra de la precipitación cristalina y se lava en porciones con 20 ml de agua y el hidracida en bruto se seca sobre ácido sulfúrico y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

10.

15.

La cristalización de 100 ml de agua hirviendo da 6,8 g (68 %) de hidracida de carbobenciloxi-L-leucilo-L-histidina pura del F. = 168-169°  $[\alpha]_D^{22} = - 27^{\circ} \pm 4^{\circ}$  (c = 0,808 en metanol) y  $[\alpha]_D^{22} = - 52^{\circ} \pm 4^{\circ}$  (c = 0,733 en HCl 1-n).

20.

La hidracida se disuelve bien en etanol frío y metanol, así como en ácido clorhídrico 1-n frío, pero solo en acetona caliente; es insoluble en éster acético.

25.

EJEMPLO 36.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-histidina.

A una solución de 16,9 g (0,1 mol) de éster metílico de L-histidina y 21,6 g (0,105 mol) de dicitclohexilo-carbodiimida en 100 ml de éster acético

30.

237288

26



- abs. y 20 ml de acetonitrilo se agregan de una vez 26,5 g (0,1 mol) de N-carbobenciloxi-L-leucina disueltos en 200 ml de éster acético abs. y la mezcla, que pronto solidifica en forma gelatinosa, se agita durante 30 minutos a
5. temperatura de ambiente. Después de dejar reposar durante la noche se aspira lo mejor posible el disolvente de la masa grumosa (frotando varias veces el residuo del filtro con poco éster acético fresco) y se seca en vacío a 90°. Se obtienen 47,8 g de una mezcla de dicitclohexil-urea y dipeptida, de la cual esta última se disuelve
10. con 3 porciones de cada una 50 ml de etanol frío. Los extractos reunidos contienen aún ligeras cantidades de dicitclohexil-urea y se limpian disolviendo en metanol y nueva precipitación con éster acético-petroléter. Se obtienen 29,3 g de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-histidina (70,5 % d.t.) del punto de fusión 131-132°.
- 15.

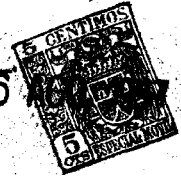
- Del filtrado de la mezcla de reacción se obtienen por extracción con ácido clorhídrico 2-n aun 4,0 g de dipeptida (9,5 % d.t.) del punto de fusión
20. aprox. 120-125° que se puede limpiar ulteriormente disolviendo y precipitando de metanol-éster acético-pétroléter.

EJEMPLO 37.

25. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-)-L-lisilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- 330 mg (0,42 mmol) de éster metílico de L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina
30. (véase ejemplo 31) y 445 mg (0,84 mmol) de N-carbobencil-

237288<sup>26</sup>



- oxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi)-L-lisina (véase ejemplo 41) se disuelven en 3 cm<sup>3</sup> de dimetilformamida, se agregan 200 mg (0,84 mmol) de 1-ciclohexil-3-morfoliniloetilo-carbodiimida y la mezcla de reacción se deja durante 21 horas a 22°. Después se vaporiza hasta secar en alto vacío a 45° y el aceite residual se lava con pequeñas porciones de agua, solución de amoníaco muy diluída y agua con lo que solidifica lentamente. El polvo se filtra en vacío, se seca (520 mg)
- 5.
10. y se lava ulteriormente con acetona y finalmente con metanol con lo que se obtiene el éster metílico de la N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi)-L-lisilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina en forma de un polvo gris insoluble en metanol. Punto de fusión aprox. 190-205°. El polvo se disuelve en dimetilformamida y se precipita con éter con lo que se obtienen 130 mg de copos del punto de fusión 210-215°. Rendimiento 24 % d.t. El octapeptida protegido se disuelve difícilmente en la
- 15.
20. mayoría de los disolventes usuales, es sin embargo de fácil disolución en dimetilformamida.

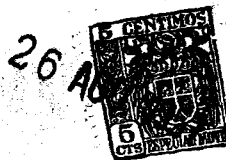
El éster metílico de la L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se obtiene como descrito en el ejemplo 32.

25. EJEMPLO 38.

Trihidrobromuro de éster metílico de la L-asparaginilo-L-lisilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

30. 53 mg (41 μmol) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi)-L-lisilo-

237288



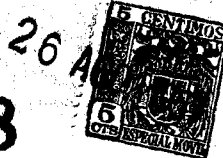
- L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-fenilalanina del punto de fusión 210-215° se mezclan con 0,3 cm<sup>3</sup> de HBr 2,5-n en ácido acético glacial y la mezcla se mantiene, bajo exclusión de humedad, durante
5. 1½ horas a 21° con lo que el material se disuelve lentamente. Al final se retira totalmente la mezcla de HBr-ácido acético glacial en alto vacío a 25° de temperatura del baño y la resina residual se lava con acetona
10. altamente higroscópico se filtra en vacío y se lava con poca acetona. Después de secar se obtienen 50 mg de trihidrobromuro en bruto del éster metílico de la L-asparaginilo-L-lisilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina del punto de fusión
15. aprox. 180-220°. El producto en bruto se sigue elaborando sin ulterior limpieza.

EJEMPLO 39.-

L-asparaginilo-L-lisilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

20. 34 mg (27 $\mu$  mol) de trihidrobromuro del éster metílico de L-asparaginilo-L-lisilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina del punto de fusión 180-220° se disuelven en 1 cm<sup>3</sup> de metanol y gota a gota se agraga NaOH 0,1-n hasta que el valor
25. pH de la solución se mantenga durante 15 minutos en 10-10,5. En total se agregan 1,81 cm<sup>3</sup> de NaOH 0,1-n (6,7 equivalentes). A continuación se pone a pH = 8 soplando CO<sub>2</sub>, el metanol se retira en vacío, el pH de la solución acuosa se pone a 8,5-9,0 agregando poca
30. solución de sosa y la solución acuosa se extrae con 3

237288



- porciones de n-butanol saturado en agua (30,20, 20 cm<sup>3</sup>). Los extractos butanólicos se lavan una vez con 3 cm<sup>3</sup> de solución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> medio saturada, se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y al vaporizar da 18 mg de L-asparaginilo-L-lisilo-L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina en bruto en forma de precipitación incolora de grano fino. El producto en bruto se recibe 3 veces en 3 cm<sup>3</sup> de agua con lo que se pueden separar 4 mg de impurezas de difícil solución en agua.
5. Las soluciones acuosas se reúnen y vaporizadas dan 14 mg de residuo. Este se lava 3 veces con 1 cm<sup>3</sup> de n-butanol seco con lo que se pueden retirar 1 mg de partes de más fácil solución en n-butanol.

- Al comprobar el efecto incrementador de la presión sanguínea en ratas el producto muestra en la rata desafiada un aumento inmediato de la presión sanguínea similar a la hipertensina. La fuerza del efecto es comparada con noradrenalina aprox. 1/10 - 1/15.

EJEMPLO 40.

20. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-)-L-lisina).
- A una solución enfriada a 0° de 12,0 g (0,041 mol) de éster metílico de N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-L-lisina y 8,6 cm<sup>3</sup> (0,061 mol) de trietiloamina en 60 cm<sup>3</sup> de toluol absoluto se gotea en el plazo de 15 minutos, bajo exclusión de humedad, la solución asimismo enfriada a 0° de 7,4 g de dietilofosfito 90 % (0,048 mol) en 20 cm<sup>3</sup> de toluol absoluto. La mezcla de reacción se mantiene durante 2 horas a temperatura ambiente; a continuación se filtra en vacío del hidrocioruro
- 25.
- 30.



237288

- trietiloamínico precipitado, se lava con poco toluol abs. y el filtrado de toluol se vaporiza en vacío hasta secar, con lo que se obtiene la dietilofosfitoamida del éster metílico de la N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-L-lisina como resina viscosa (peso 17,0 g). Se disuelve en 60 cm<sup>3</sup> de dietilofosfito se agregan 10,9 g de N-carbobenciloxi-L-asparagina seca bien pulverizada (0,041 mol) y la mezcla se calienta durante 1 hora a 80° con lo que, después de pocos minutos, se disuelve la N-carbobenciloxi-L-asparagina. Después de 1 hora se destila totalmente el dietilofosfito bajo presión reducida, la resina residual se recibe en mucho éster acético y la solución éster acética se lava con ácido clorhídrico diluído, agua, solución de sosa diluída y agua. La fase éster acética deja, después de secar con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y vaporizar, 13,0 g de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-)-L-lisina en bruto en forma de masa gelatinosa. Después de disolver y precipitar dos veces de metanol-éter se obtienen 8,5 g del producto como precipitación en forma de copos; punto de fusión 152-161°; Rendimiento 38 % del teórico).
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

EJEMPLO 41.

N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-)-L-lisina.

25. 5,00 g (0,0092 mol) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-)-L-lisina del punto de fusión 152-161° se disuelven en 60 cm<sup>3</sup> de dimetilformamida y en porciones se agrega sosa cáustica 1-n hasta <sup>que</sup> el valor pH de la solución se mantenga durante 20 minutos en 10-10,5 (en total 140 cm<sup>3</sup>
- 30.

237288



- de NaOH 0,1-n agregado). A continuación se pone agregando CO<sub>2</sub> sólido a pH = 8 y la mezcla dimetiloformamida-agua se estrecha primero en vacío, después en alto vacío a un pequeño volumen. El residuo se mezcla con agua, con lo que se precipita la sal sódica de la N-carbo-benciloxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-)-L-lisina como masa espesa gelatinosa. Se disuelve agregando mucha agua (aprox. 200 cm<sup>3</sup>) y se filtra de algo sin disolver y el filtrado se pone enfriando con hielo con HCl concentrado a pH = 1. La precipitación en forma de copos se filtra en vacío, se lava con agua de hielo, se seca y se recristaliza dos veces de metanol-éter. Se obtienen 3,2 g de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-(N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-)-L-lisina (agujas finas) del punto de fusión 175-181° (rendimiento 74 % del teórico). El producto se disuelve en álcalis muy diluidos, con sosa cáustica 2-n o solución de sosa se forma una sal sódica gelatinosa de muy difícil solución.

EJEMPLO 42.

20. Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- A la solución de 802 mg (1 mmol) de éster metílico de L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (véase ejemplo 48) en 6 ml de dimetiloformamida recién destilada se agregan 360 mg (1,5 mmol) de dicitclohexilocarbodiimida y después de corto tiempo 710 mg (1,5 mmol) de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginina (véase ejemplo 2) en 6 mg de dimetiloformamida. Se deja reaccionar durante la

26 AGO 1953

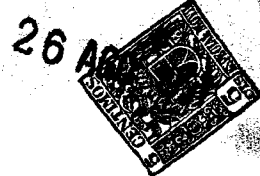
237288

- noche a temperatura de ambiente, se filtra de la dicitclohexilurea y el disolvente se vaporiza en alto vacío a 40°. El residuo espumoso se seca durante otra hora a 40° y 0,01 mm Hg, se le frota a continuación con mucho éster acético y el producto en forma de polvo se seca nuevamente en alto vacío. Para la ulterior limpieza se lava el producto en bruto repetidas veces con mucha acetona y metanol frío como el hielo. Se obtienen 280 mg (22 %) de éster metílico de N-carbobenciloxi-octapeptida;
- 5.
10. F. = 204-206°.

EJEMPLO 43.

Trihidrocloruro del éster metílico de L-asparaginilo-L-arginilo-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

15. 210 mg (0,22 mmol) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se hidrizan en 30 ml de metanol abs. en presencia de ácido clorhídrico 4 equivalente y 200 mg de carbón Pd (10 % Pd) bajo condiciones normales. El CO<sub>2</sub> formado se absorbe en un 2° recipiente de hidrización con sosa cáustica diluída). Después de 17 horas se ha recibido algo más de la cantidad de hidrógeno calculada. Se filtra el catalizador, la solución se vaporiza a
- 20.
25. 40° a un volumen pequeño y se mezcla con mucho éter. De esta manera se precipita el trihidrocloruro del éster octapeptídico junto con cloruro amónico como producto blanco granuloso. Rendimiento 240 mg (270 mg calculado para trihidrocloruro y cantidad equimolar de cloruro amónico .
- 30.



237288

El producto se sigue elaborando sin ulterior limpieza. Se disuelve bien en metanol, etanol y agua.

EJEMPLO 44.

L-asparagilo-L-arginilo-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

5.

100 mg de éster metílico de L-asparaginilo-L-arginilo-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se mantienen en 2 ml de ácido clorhídrico puro concentrado durante 85 minutos a 37°.

10.

El ácido clorhídrico se vaporiza rápidamente en vacío a 25° y el residuo se seca sobre hidróxido de sodio y pentóxido de fósforo.

15.

Para limpiar se disuelve el producto en bruto espumoso calentando ligeramente en 1,5 ml de etanol y el trihidrocloruro octapeptídico se precipita con 8 ml de acetona. Centrifugando y lavando con dos porciones de 2 ml de acetona se obtienen 90 mg de trihidrocloruro de L-asparagilo-L-arginilo-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

20.

En la rata desrionada muestra 20 veces más eficacia que la noradrenalina.

25.

Por distribución Craig o cromatografía en polvo de papel en mezclas de disolventes adecuados (p.e. butanol-metanol-0,33 m  $\text{NH}_4\text{-COOH}$  o butanol sec.-3%  $\text{NH}_3$  120:44) se puede separar la L-asparagilo-L-arginilo-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina de la L-asparaginilo-L-arginilo-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.



237288

EJEMPLO 45.

Ester metílico de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-tirosina.

- 940 mg (3,5 mmol) de N-carbobenciloxi-L-leucina se disuelven en 10 ml de tetrahidrofurano abs.
5. se agregan 800 mg (10 % de exceso) de dicitclohexilcarbodiimida y a continuación 690 mg (3,5 mmol) de éster metílico de tirosina disueltos en 15 ml de tetrahidrofurano abs. Se deja reaccionar durante la noche, se filtra de la dicitclohexilurea precipitada
10. y el disolvente se vaporiza en vacío a 40°. El residuo de vaporización se lava en éster acético con ácido clorhídrico 1-n, agua, solución de bicarbonato de sodio 2-n y neutral con agua; se seca la solución éster-acética sobre sulfato de sodio y el disolvente se vaporiza en vacío. Se aislan 1,4 g (90%) de éster carbobenzoxi-dipeptídico. Disolviendo y precipitando dos veces el éster en bruto de éster acético/petroléter se obtiene el éster metílico de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-tirosina en forma pura, pero amorfa  $[\alpha]_D^{22} = -14 \pm 4^\circ$  (c = 1,108 en metanol).
15. 20.

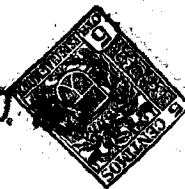
El mismo éter metílico de carbobenciloxi-L-leucilo-L-tirosina obtenido por el método de anhídrido mezclado tiene  $[\alpha]_D^{22} = -11^\circ \pm 2^\circ$  (c = 1,631 en etanol).

EJEMPLO 46

25. N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-tirosina.

- A 2,37 g (5,3 mmol) de éster metílico de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-tirosina se agregan 13,5 ml de NaOH 1-n, se agita hasta la disolución total (5 minutos y saponifica durante 1 hora a temperatura ambiente.
30. La solución alcalina se extrae 1 vez con 5 ml de éster

237288<sup>26</sup>60



- acético, la fase orgánica se lava aun una vez con poca agua y las soluciones acuosas reunidas se liberan en vacío durante 10 minutos del éster acético. Con 13,5 ml de HCl 1-n se precipita la carbobenzoxidipeptida
5. como masa pegajosa, que en la nevera solidifica, a temperatura ambiente sin embargo se vuelve a derretir. Se decantiza de la lejía madre, se lava el residuo gomoso 3 veces bien con agua y se seca sobre KOH y pentóxido de fósforo en alto vacío, Se obtienen 1,9 g
10. (80 %) de carbobenciloxi-L-leucilo-L-tirosina amorfa que no se ha podido cristalizar. La distribución multiplicativa (Craig - Proceso base) sobre 30 escalones entre metanol al 80% como fase superior y cloroformo:tetraclorocarbono 1:1 como fase inferior (K = 1,54) da
15. asimismo un producto no cristalino.

EJEMPLO 47.

Estermetílico de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

- La solución de 1,03 g (2,4 mmol) de N-carbobenciloxi-L-leucilo-L-tirosina en 10 ml de acetonitrilo seco se mezcla con 520 mg (5 % de exceso) de dicitclohexilcarbodiimida y la solución de 1,38 g (2,5 mmol) de éster metílico de L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina (véase ejemplo 15) en 10 ml de acetonitrilo.
20. Se precipita momentáneamente la dicitclohexilurea. Después de unas 6 horas empieza la separación del éster N-carbobenciloxi-heptapeptídico como masa gelatinosa. Se deja
25. reposar durante 2 días a temperatura ambiente en la oscuridad y a continuación se vaporiza el acetonitrilo a 40° bajo presión reducida. El residuo se digiere con
- 30.

26 AGO



237288

5. 5 ml de metanol frío como el hielo, se filtra de la dicitclohexilurea y se lava 3 veces, cada una con 1 ml de metanol frío como el hielo. El metanol se vaporiza en vacío y el residuo en cloroformo se lava tres veces con 2 ml de ácido clorhídrico 2-n, 5 veces con 2 ml de solución de bicarbonato de sodio frío como el hielo y con agua.

10. La solución secada sobre sulfato de sodio se hierve brevemente con poco carbón activo, se filtra y el cloroformo se vaporiza totalmente. Disolviendo y precipitando una vez de cloroformo/éter se obtienen 1,7 g (76 %) de éster metílico de carbobenzoxihexapeptida.

15. El preparado de análisis muestra después de disolver y precipitar 3 veces de cloroformo el F. =  $139-141^{\circ} \left[ \alpha \right]_D^{22} = - 51^{\circ} \pm 4^{\circ}$  (c = 1,87 en metanol).

EJEMPLO 48.

Ester metílico de L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

20. 1,2 g (1,28 mmol) de éster metílico de N-carbocenciloxi-L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina se disocian hidrógenolíticamente en 20 ml de metanol absoluto que contienen 2 equiv. de ácido clorhídrico, en presencia de 300 mg de carbón Pd (10 % Pd). Después de 2 horas se ha recibido algo más de la cantidad de hidrógeno calculada. La solución

25. librada del catalizador se vaporiza en vacío a 40° hasta secar, se disuelve el residuo en 10 ml de agua de hielo y a la solución clara se agregan 2,6 mmol de carbonato

30. sódico disuelto en 10 ml de agua. El éster hexapeptídico precipitado se extrae con 25 ml y dos veces con 10 ml

26 AGO



237288

- de butanol/cloroformo 1:1, las fases acuosas se lavan 3 veces con 5 ml de agua, se seca sobre sulfato de sodio y se estrecha en vacío a un pequeño volumen. Agregando mucho éter seprecipita el éster hexapeptídico cuantitativamente. Disolviendo y precipitando de cloroformo/éter se obtienen 840 mg (81 %) de un producto amorfo del F. = 130-140°. El producto está lo suficientemente limpio para su ulterior elaboración.
- 5.

N O T A

10. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También
15. se hace constar que el invento corresponde a las patentes presentadas en Suiza con las fechas y números siguientes: 37189 de 6 de septiembre de 1956, 42508, de 8 de febrero de 1957, 43519 de 6 de marzo de 1957 y 49007 de 31 de julio de 1957, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor,
20. y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España: "Procedimiento para la obtención de polipeptidas nuevas y de sus derivados"; caracterizándose por lo siguiente:
- 25.

- 1.- Procedimiento para la obtención de polipeptidas nuevas y de sus derivados, caracterizado porque en los restos de una L-asparagina con grupo amino protegido, un L- $\alpha$ -(amino-alquilo bajo)-amino-ácido acético con grupo amino protegido, un L- $\alpha$ -amino-alquilo
- 30.

26 AGO.



237288

bajo-ácido acético, una L-tirosina con grupo oxi libre o sustituido, un L- $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácido acético, de la L-histidina, de la L-prolina y un éster L-fenilalanínico, en forma amídica, se unen entre sí bajo formación de una octapeptida con la mencionada secuencia de los restos de ácido aminocarbónicos indicados y, si se desea, en la peptida así obtenida se liberan el grupo carboxílico esterificado del resto fenilalanínico, los grupos amino protegidos del resto asparagina- y L- $\alpha$ - (amino-alquilo bajo)-amino-ácido acético y, en caso dado un grupo oxi sustituido del resto tirosínico y, en caso dado, el grupo carbonilamídico del resto asparagínico se transforma en un grupo carboxílico libre.

5. 2<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizado porque en 3<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> lugar de la octapeptida se emplea el mismo  $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácido acético para la síntesis de la octapeptida.

10. 3<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizado porque en 3<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> lugar de la octapeptida se emplean diferentes  $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácidos acéticos para la síntesis de la octapeptida.

20. 4<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicación 1-3, caracterizado porque como  $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácido acético se emplea valina.

25. 5<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-3, caracterizado porque como  $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácido acético se emplea isoleucina.

30. 6<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-3, caracterizado porque como  $\alpha$ -amino-alquilo bajo-ácido acético se emplea leucina.

237288

26



- 7<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-6, caracterizado porque como  $\alpha$ -amino-(amino-alquilo bajo)-ácido acético se emplea una L-arginina con grupo amidínico protegido.
5. 8<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-6, caracterizado porque como  $\alpha$ -amino-(amino-alquilo bajo)-ácido acético se emplea una lisina con grupo  $\xi$ -amino protegido.
10. 9<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la Nitro-L-arginina se acila con una L-asparagina que presenta un grupo amino protegido y la L-asparaginilo-nitro-L-arginina, así obtenida, se emplea para la síntesis de una polipeptida según las reivindicaciones 1-6.
15. 10<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-6 y 8, caracterizado, porque la N $\xi$ -carbocenciloxi-L-lisina se acila con una L-asparagina que presenta un grupo amino protegido y la L-asparaginilo-(N $\xi$ -carbocenciloxi)-L-lisina, así obtenida, se emplea para la síntesis de una polipeptida según las reivindicaciones 1-6 y 8.
20. 11<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-7 y 9, caracterizado porque se condensa una L-asparaginilo-nitro-L-arginina con un éster de L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.
25. 12<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-7 y 9, caracterizado porque se condensa una L-asparaginilo-nitro-L-arginina con un éster de L-leucilo-L-tirosilo-L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.
30. 13<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones

26 AGO

237288



1-7 y 9, caracterizado porque se condensa una L-asparaginilo-nitro-L-arginina con un éster de L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.

14<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones

5. 1-7 y 9, caracterizado, porque se condensa una L-asparaginilo-nitro-L-arginina con L-valilo-L-tirosina a una L-asparaginilo-nitro-L-arginilo-L-valilo-L-tirosina y ésta se reacciona con un éster de L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina a octapeptida.

10. 15<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones

1-7, 9 y 11, caracterizado porque L-valilo-L-tirosina se acila con una L-valilo-L-histidina, la L-valilo-L-tirosilo-L-valilo-L-histidina se reacciona con L-prolilo-L-fenilalanina a hexapeptida y ésta, con L-asparagilo-nitro-L-arginina, a octapeptida.

15.

16<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones

1-7, 9 y 13, caracterizado porque se condensa L-valilo-L-tirosina y L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina a hexapeptida y esta, con L-asparaginilo-nitro-L-arginina, a octapeptida.

20.

17<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones

1-16, caracterizado porque se parte de cualquier producto intermedio obtenido en cualquier etapa del procedimiento y se siguen efectuando las etapas del procedimiento que faltan, o porque se prescinde de la ejecución de las etapas del procedimiento que faltan en cualquier etapa del procedimiento y, si se desea,

25.

en la polipeptida obtenida se liberan un grupo carboxílico o hidroxílico funcionalmente modificado y grupos aminoprotégidos.

30.

237288

26



- 18<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-17, caracterizado porque una L-lisina con grupo  $\epsilon$ -amino protegido se condensa con L-asparagina a una L-asparaginilo-lisina con grupo  $\epsilon$ -amino protegido.
5. 19<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-3, 5-10 y 12, caracterizado porque L-leucina se condensa con L-tirosina a L-leucilo-L-tirosina.
- 20<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-5, caracterizado porque L-isoleucina se condensa con L-histidina a L-isoleucilo-L-histidina.
10. 21<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-4 y 6, caracterizado porque L-leucina se condensa con L-histidina a L-leucilo-L-histidina.
- 22<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-4 y 6-10, 16-18 y 21, caracterizado porque L-leucilo-L-histidina se acila con la L-prolilo-L-fenilalanina a L-leucilo-L-histidina-L-prolilo-L-fenilalanina.
15. 23<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-5, 7-10, 14, 17-18 y 20, caracterizado porque L-isoleucilo-L-histidina se acila con la L-prolilo-L-fenilalanina a L-isoleucilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina.
20. 24<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-4, 7, 9 y 17, caracterizado porque L-asparaginilo-nitro-L-arginina-L-valilo-L-tirosina se condensa con L-valilo-L-histidilo-L-prolilo-L-fenilalanina a una octapeptida.
25. 25<sup>a</sup>.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-4, 6, 8, 10, 17, 18, 21, 22, caracterizado porque L-asparaginilo-(N $\epsilon$ -carbobenciloxi)-L-lisina se condensa con L-valilo-L-tirosilo-L-leucilo-L-histidilo-L-prolilo
- 30.

26 AGO



237288

-L-fenilalanina a una octapeptida.

5. 26ª.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-25, caracterizado porque los grupos amino libres, que no participan en la reacción, se protegen pasajeramente.

27ª.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-26, caracterizado porque los grupos amino libres, que no toman parte en la reacción, se protegen mediante restos disociables por hidrólisis.

10. 28ª.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-27, caracterizado porque los ácidos amino a acilar se emplean en forma de sus ésteres.

15. 29ª.- Procedimiento, según reivindicaciones 1-28, caracterizado porque en los productos del procedimiento obtenidos los grupos carboxílicos libres se trasladan funcionalmente modificados, especialmente en ésteres o amidas y los grupos amino libres se sustituyen resp. se alquilizan o acilan.

20. 30ª.- Procedimiento para la obtención de polipeptidas nuevas y de sus derivados; tal y como queda substancialmente descrito en la presente memoria que consta de sesenta y cinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 26 AGO. 1957

CIBA SOCIÉTÉ ANONYME.

J. GOMEZ ACEBO Y MOBEI  
P. P.