

AÑO

Expediente núm.



238578

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

238578

CERTIFICADO DE ADICION

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

un **CERTIFICADO DE ADICION** en España,

a favor de

CIBA SOCIÉTÉ ANONYME, entidad suiza., de nacionalidad

..... domiciliado en Basilea, Suiza.

calle de núm.

por:

« Mejoras introducidas

..... », en el objeto de la patente principal núm 219.542

que fué concedida en 15 de noviembre de 1955 por

« Nuevo procedimiento para la obtención de amidas"

SEGUNDO CERTIFICADO DE ADICION
=====

OIDA. CASE 3685
=====



2385784 N

238578

MEMORIA DESCRIPTIVA

sobre:

"Mejoras introducidas en el objeto de la patente
"principal nº 219.642 concedida en 15 de Noviembre de
"1955, por "NUEVO PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE AMIDAS".

=====

SOLICITANTE: O I D A, Société Anonyme, entidad suiza, domiciliada
en BASILEA, Suiza.

=====

El presente Certificado de Adición tiene por
objeto ciertos perfeccionamientos introducidos en la
obtención del antibiótico gramizidina S, o sea un decapep-
tido cíclico con la doble presencia de la secuencia ácido-
am nica (L-valino-L-ornitino-L-leucino-D-fenilalanina-L-
prolino).

5.

De acuerdo con la patente principal n  219.642
(Case 3245/1-3), se obtienen amidas mediante reacción
con aminas de ésteres de ácido carbónico, que en el compo-
nente alcohólico muestran un sustituyente atrayente de

10.

238578

14 NOV 1950



electrones. En el primer Certificado de Adición nº 231.337 (Case 3483/1-3) se protege el empleo de este procedimiento para la obtención de polipeptidas lineares o cíclicas.

Entre otros se describe un procedimiento para la obtención

5. de la gramicidina S. Se caracteriza porque una sal de un éster prolínico linear de 10 miembros, correspondiente a la gramicidina, cuyos grupos α -amínicos de los

restos ornitínicos están protegidos y que en el componente alcohólico muestra un sustituyente atrayente de electrones,

10. por ejemplo, el trifluoroacetato del correspondiente éster decapeptida-p-nitrofenílico, se trata con agentes básicos y a continuación los grupos amino protegidos se transforman en grupos amino libres. Este procedimiento resulta complicado, porque la sal del éster decapeptídico, empleada como

15. producto inicial, se ha de obtener de la pentapeptida.

Se ha descubierto ahora que se puede obtener la gramicidina S en forma sencilla si una sal de un éster penta-

20. peptídico con la secuencia ácido amínica de la gramicidina, es decir, un éster de ácido L-valilo-L-ornitilo-L-leucilo-

20. D-fenilalanilo-L-prolino-carbónico, cuyo grupo α -amínico del resto ornitínico está protegido y que en el componente alcohólico presenta un sustituyente atrayente de electrones, se trata con agentes básicos y después los grupos α -amínicos protegidos se transforman en grupos amino libres. Fué

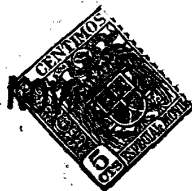
25. sorprendente que en este caso no se originara una autociclización de la molécula del pentapeptida, sino que dos moléculas de peptida se reunieran directamente al decapeptida cíclico.

Una duplicidad de los componentes del anillo durante la formación de un polipeptida cíclico hasta ahora solo fué

30. observada en el c-hexaglicilo que se obtiene de la



- triglicinopeptida linear, por ejemplo, por el procedimiento descrito. Esta forma de reacción de los derivados triglicínicos se consideró hasta ahora como una excepción que quizás estuviera justificada por una determinada inestabilidad del c-triglicilo (Helv.Chim.Acta 39, 879 (1956)).
5. Otros tripeptidas, tales como por ejemplo la glicilo-DL-fenilalanil-glicina y la glicilo-glicilo-DL-fenilalanina dieron el tripeptida cíclico y no hexapeptida. Tampoco la tetraglicinopeptida duplica su molecula durante el cierre del anillo. Además es conocido el c-glicilo-L-leucilo-glicilo-L-leucilo-glicilo, que se obtiene del tioéster del hidrobromuro de la pentapeptida por autociclización.
10. Ya se mencionó la decapeptida cíclica de la gramicidina que se obtiene de la correspondiente decapeptida linear, asimismo sin duplicación de la molécula. Una duplicación de la L-valilo-L-ornitilo-L-leucilo-D-fenilalanilo-L-prolino-pentapeptida durante la ciclización era por lo tanto imprevisible. La nueva síntesis de gramicidina es, debido a su sencillez, un importante avance técnico. El procedimiento se efectúa ,partiendo de la L-valilo-L-ornitilo-L-leucilo-D-fenilalanilo-L-prolina en la forma descrita en la patente principal nº 219.642 y en la primera adición nº 231.337. El grupo α -amínico del resto ornitínico se deberá proteger durante la reacción, convenientemente mediante la introducción de un resto, que, sin abrir el anillo, se puede disociar, como por ejemplo el resto tosilo-, tritilo-, carbobenzoxi- o trifluoroacetílico. El componente alcohólico del éster empleado como material inicial puede ser cualquier resto orgánico que presente uno o
15. varios sustituyentes atrayentes de electronos, especialmente
- 20.
- 25.
- 30.



el grupo ciano, nitro, sulfo o metanosulfonílico, que preferentemente estén separados del éster-oxígeno por una cadena carbónica de 1-5 átomos de C. Ejemplos de tales componentes alcohólicos son por ejemplo el resto del alcohol cianmetílico o del p-metanosulfonilfenol.

5.

Las sales del éster del ácido peptidocarbónico empleadas como material inicial, que en el componente alcohólico muestran un sustituyente atrayente de electrones, se pueden obtener por ejemplo por reacción

10.

de la N-trifenilometilo-pentapeptida con ^{un}éster halógeno-hidrogénico del correspondiente alcohol en presencia de una base orgánica terciaria y ulterior disociación del resto trifenilometílico por tratamiento con ácido diluido o por hidrización catalítica de un éster correspondiente

15.

de la N-carbobenzoxi-pentapeptida en presencia de un ácido. Como sales adecuadas para la reacción según la presente invención caben mencionar especialmente las de los ácidos halogeno-hidrogénicos, tales como ácido clorhídrico o de ácidos grasos halogenados, tales como el ácido trifluoroacético.

20.

Como agentes alcalinos para la reacción según la presente invención se emplean por ejemplo bases inorgánicas, tales como alcalihidróxidos o carbonatos, o bases orgánicas preferentemente aminas terciarias.

25.

El procedimiento se realiza ventajosamente en presencia de disolventes orgánicos, tales como dimetilformamida, acetonitrilo, dioxano, tetrahidrofurano o sus mezclas, en caso dado, también en presencia de agua. El rendimiento se puede aumentar mediante la adición de catalizadores ácidos a la sal del éster peptídico, por

30.



ejemplo, ácido acético glacial o ácido sulfúrico.

La invención se describe con más detalle en el siguiente ejemplo. Las temperaturas están indicadas en grados Celsio.

5. EJEMPLO.

340 mg. de trifluoroacetato de éster L-valilo-N^S -
tosilo-L-ornitilo-L-leucilo-D-fenilalanilo-L-prolino-nitrofení-
lico se disuelven en 6 ml. de dimetilformamida, se mezcla
con 6 gotas de ácido acético glacial y en 5 horas, agitando,

10. a 55° C. se gotea en 70 ml. de piridina. A continuación
se sigue agitando durante 2 horas a esta temperatura, después
se vaporizan los disolventes totalmente en vacío. El

residuo se disuelve en 60 ml. de metanol-isopropanol-agua,
1:1:1, y se filtra a través de una columna con intercambia-

15. dores de iones fuertemente ácidos y a través de una columna
con intercambiadores de iones fuertemente básicos.

Este se lava aún con 200 ml de la misma mezcla, los filtra-
dos reunidos se vaporizan en vacío hasta secar. El residuo
se cristaliza de metanol-agua con lo que se obtienen 125 mg.

20. de Di- \int -tosilo-gramicidina S en forma del dihidrato.

La lejía madre se vaporiza hasta secar y el residuo se cro-
matografía en 2 g. de óxido de aluminio. Con cloroformo y con
éster acético se pueden eluir 20 mg. de producto en bruto;
estos dán, después de recristalizar de metanol-agua, aún 10

25. mg. de di-hidrato de Di-tosilo-gramicidina-S puro. El
rendimiento total es por lo tanto de 135 mg.= 31% d.t.

Este producto se transforma en la gremicidina S de la
siguiente forma: 60 mg. del dihidrato de la Di-tosilo-
gramicidina S se disuelven en 20 ml. de amoníaco líquido y

30. se mezcla con 100mg. de sodio (en trozos pequeños). Terminada



14

la disolución del sodio queda la solución de color azul.

Agregando poco cloruro de amonio se evapora el amoniaco y el residuo se libera en alto vacío del mercaptano formado.

El producto de reacción se recibe con etanol absoluto al

- 5. que se la han agregado algunas gotas de una solución de ácido clorhídrico en éster acético. El disolvente se vaporiza después de la filtración. El residuo se disuelve en pocas gotas de etanol al 65% y se mezcla a 50° tanto con agua hasta que se forme un enturbiamiento señalado. A continuación cristaliza
- 10. el dihidrocloruro de la gramimidina S en forma de agujas finas. Punto de fusión 268-270° C. bajo descomposición (introducción del tubito del punto de fusión a 250° C.)

La sal trifluoroacética del éster L-valilo-N^δ-tosilo-L-ornitilo-L-leucilo-D-fenilalanilo-L-prolino-p-nitrofenílico, empleada como material inicial, se puede obtener de la siguiente manera:

- 15. 500 mg. de N-tritilo-L-valilo-(N^δ-tosilo)-L-ornitilo-L-leucilo-D-fenilalanilo-L-prolino (obtenida por ejemplo segun la patente adicional N° 231.337) y 800 mg. de Di-(p-nitrofenilo)-sulfito se dejan reposar en 1,5 ml. de piridina absoluta durante 20 horas a temperatura de ambiente. La mezcla de reacción se diluye entonces con éster acético, se agita tres veces con una solución de ácido cítrico, después con agua, se seca sobre sulfato de sodio y se vaporiza en vacío hasta secar. La resina residual se frota con éter-petroléter 1:1 con lo que ^{queda} el éster nitrofenílico sólido. El rendimiento es de 550 mg. = 98 % d.t.
- 20.
- 25.

435 mg. del éster nitrofenílico así obtenido se disuelven en 10 ml. de ácido trifluoroacético y a -5° C. se mezcla lentamente con 10ml. de agua. Se forma una

30.



precipitación de trifenilcarbinol. Los disolventes se vaporizan totalmente en alto vacío a 30° C., después se frota el residuo varias veces con éter-petroléter 1:1 y éter abs. Como precipitación sólida se obtienen 340 mg. de trifluoroacetato.

5.

N O T A

Describe 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 se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Suiza con fecha 19 de Diciembre de 1956 n° 40869, acogiéndose, por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor y siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicite Segundo Certificado de Adición en España: "Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal n° 219.642 concedida en 15 de noviembre de 1955, por "NUEVO PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE AMIDAS"; caracterizándose dichas mejoras por lo siguiente:

10.

15.

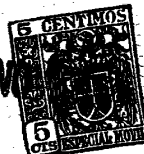
20.

25.

30.

12.- Mejoras en el procedimiento para la obtención de amidas, objeto de la patente principal, caracterizándose porque una sal de un éster del ácido L-valilo-L-ornitilo-L-leucilo-D-fenilalanilo-L-prolino-carbónico, cuyo grupo α -amínico del resto ornitínico está protegido y que en el componente alcohólico presenta un sustituyente atrayente de electrones, se trata con agentes básicos y a continuación los grupos β -amínicos protegidos se transforman en grupos amino libres.

238578



2^a.- Mejoras, segun lo especificado en la reivindicación 1^a, caracterizándose porque se emplean sales de un éster que en el componente alcohólico presente un grupo ciano.

5. 3^a.- Mejoras, según reivindicación 1^a, caracterizándose porque se emplean sales de un éster que en el componente alcohólico presente un grupo nitro.

10 4^a.- Mejoras, segun reivindicación 1^a, caracterizándose porque se emplean sales de un éster que en el componente alcohólico presente un grupo sulfónico.

5^a.- Mejoras, segun reivindicaciones 1^a y 2^a, caracterizándose porque se emplean sales del éster ciano-metílico.

15. 6^a.- Mejoras, segun reivindicaciones 1^a y 3^a, caracterizándose porque se emplean sales del éster p-nitro-fenílico.

7^a.- Mejoras según reivindicaciones 1^a y 4^a, caracterizándose porque se emplean sales del éster p-metano-sulfonilo-fenílico.

20. 8^a.- Mejoras, segun reivindicaciones 1^a - 7^a, caracterizándose porque el sustituyente en el componente alcohólico está separado del éster -oxígeno por una cadena de nitrógeno de 1-5 átomos de carbono.

25. 9^a.- Mejoras, segun reivindicaciones 1^a - 8^a, caracterizándose porque el grupo \int -amínico del resto ornitínico se protege por el resto tosílico.

10^a.- Mejoras, segun reivindicaciones 1^a - 8^a, caracterizándose porque el grupo \int -amínico del resto ornitínico se protege por el resto tritílico.

30. 11^a.- Mejoras, segun reivindicaciones 1^a - 8^a,



caracterizándose porque el grupo δ -amínico del resto ornitínico se protege por el resto carbobenzoxi.

5. 12^a.- Mejoras, según reivindicaciones 1^a - 8^a, caracterizándose porque el grupo δ -amínico del resto ornitínico se protege por el resto trifluoroacetílico.

13^a.- Mejoras según reivindicaciones 1^a - 12^a, caracterizándose porque como sal del éster pentapeptídico se emplea el trifluoroacetato.

10. 14^a.- Mejoras según reivindicaciones 1^a - 13^a, caracterizándose porque como agentes básicos se emplean bases orgánicas terciarias.

15. 15^a.- Mejoras según reivindicaciones 1^a - 14^a, caracterizándose porque se reacciona en presencia de un catalizador.

20. 16^a.- Mejoras introducidas en el objeto de la patente principal n^o 219.642 concedida en 15 de Noviembre de 1956, por "NUEVO PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE AMIDAS"; tal y como queda substancialmente descrito en la presente memoria, que consta de nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

14 NOV. 1957

C I B A, Société Anonyme.

J. GOMEZ ALEJO Y MODET
P.F.