

258133



PATENTE DE INVENCION

CIBA CASE 4286/1 + 2.

258133

## Memoria Descriptiva

sobre:

" Procedimiento para la obtención de nuevos  
polipepturos "

*Solicitante:* CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza, domiciliada en  
Basilea, Suiza.

El objeto de la invención es la obtención de  
un octadecapepturo nuevo de la fórmula ácido L-asparaginilo-  
L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo-L-lisilo-L-metionilo-  
L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-trip  
5. tofilo-glicilo-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo-L-lisilo-L-aspa  
ragínico-, así como del compuesto correspondiente que, en



- lugar del resto glutamínico, muestra el resto del ácido glutamínico, y de sus derivados y sales de adición de ácido. Los nuevos compuestos tienen el efecto de la hormona hipofisaria natural  $\beta$ -MSH estimuladora de melanocitos, muestran, sin embargo, con respecto a ésta, la ventaja de que se pueden sintetizar con más facilidad. Los nuevos octadecapepturos se pueden emplear en lugar de los MSH naturales como medicamentos o como productos intermedios para la obtención de  $\beta$ -MSH.
- 5.
10. Los nuevos pepturos se obtienen según los métodos conocidos para la preparación de pepturos, ligándose los ácidos amínicos en la secuencia mencionada bien individualmente o bien después de previa formación de pequeñas unidades de pepturo. Así se puede ligar una de las moléculas del ácido amínico respecto del pepturo en forma de un éster con otra molécula del ácido amínico o del pepturo, que contiene un grupo amínico protegido, en presencia de un medio de condensación, tal como un carbodiimida o un halogenuro del éster del ácido fosfórico, o con el éster del ácido amínico,
- 15.
20. respecto al éster peptúrico con grupo amínico libre, se puede reaccionar un ácido amínico respecto un pepturo con grupo carboxílico activado (y grupo amínico protegido), por ejemplo un halogenuro, azuro, anhídrido, imidazoluro de ácido ó un éster activado, tal como el éster cianmetílico o el
25. éster carboximetilolotílico. Al revés, se puede reaccionar también un ácido amínico respecto un pepturo con grupo carboxílico libre (y grupo amínico protegido) con un ácido amínico respecto un pepturo con grupo amínico activado (y grupo carboxílico protegido), por ejemplo un amida fosfítica. Todos



Los métodos mencionados se pueden aplicar para cada una de las formaciones de uniones de pepturo que, según la invención, entran en consideración, pero los procedimientos mencionados en los ejemplos son especialmente ventajosos.

- 5. Los nuevos octadecapepturos se pueden sintetizar también por ligado sucesivo de los distintos ácidos amínicos o pequeñas unidades de pepturos. Ventajosamente se obtienen, si el heptapepturo L-asparaginilo-L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo-L-lisilo-L-metionina, con grupos amínicos protegidos, ó sus derivados reaccionables, se ligan
- 10. con el undecapepturo ácido L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo-L-lisilo-L-asparagínico, cuyos grupos carboxílicos están funcionalmente modificados y cuyo grupo
- 15.  $\angle$  -amínico del resto lisílico está protegido, respecto con el compuesto correspondiente que, en lugar del resto glutamínico, contiene el resto del ácido glutamínico, ó sus derivados reaccionables, bajo formación de una unión peptúrica entre el resto L-metionílico y el resto L-glutamínico o glutamílico.
- 20.

La obtención de la unión peptúrica se efectúa preferentemente en presencia de carbodiimida como medio de condensación.

- 25. Los grupos libres, funcionales, que no participan en la reacción, existentes en los materiales de partida, se protegen convenientemente, especialmente mediante restos fácilmente dissociables por hidrólisis o reducción, el grupo carboxílico, preferentemente por esterización, por ejemplo con metanol, alcohol bencílico, alcohol p-nitrobencílico

258133



- o por amidización, los grupos amínicos, por ejemplo, por introducción del resto tosílico o tritílico, ó especialmente del grupo carbobenzoxi o grupos protectores de color, tal como el grupo p-fenilazo-benciloxi-carbonílico.
5. Para proteger el grupo  $\text{NH}_2$ -amínico de los restos lisílicos se emplea preferentemente el resto tosílico. La transformación de un grupo  $\text{NH}_2$  protegido en un grupo libre, así como la transformación de un grupo carboxílico funcionalmente modificado en un grupo carboxílico libre se efectúa según
10. métodos en si conocidos, mediante tratamiento con medios hidrolizantes respectivamente reductores.

- Los hepta- respectivamente undecapepturos empleados como material de partida y sus derivados se obtienen según los métodos conocidos para la obtención de pepturos
15. arriba descritos.

- El undecapepturo ácido-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo-L-lisilo-L-asparagínico, respecto el compuesto correspondiente, empleado como material de partida
20. que en lugar del resto glutaminílico contiene el resto del ácido glutamínico, muestra una buena actividad MSH y se puede por lo tanto emplear también como medicamento.

- Según el modo de trabajo se obtienen los nuevos compuestos en forma de bases o de sus sales. De las sales se pueden obtener, en forma conocida, las bases. De estas
25. últimas a su vez se pueden obtener las sales por reacción con ácidos adecuados para la formación de sales de aplicación terapéutica, tal como por ejemplo con ácidos inorgánicos, tal como ácidos halogeno hidrogénicos, por ejemplo



- ácido clorhídrico ó ácido bromohidrogénico, ácido nítrico, ácido tiociánico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ó con ácidos orgánicos, tal como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirogálico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleínico, ácido fumárico, ácido tártrico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinamónico, ácido salicílico, ácido 2-fenoxi-ó 2-acetoxibenzoico, ácido amigdálico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido benzol-ó toluolsulfónico, ácidos naftalinsulfónicos, ácido sulfanílico.

- Los octadecapepturos obtenidos según la presente invención se pueden emplear en forma de preparados farmacéuticos. Estos contienen los pepturos en mezcla con un material vehículo orgánico o inorgánico, farmacéutico, adecuado para aplicación enteral o parental. Como tales entran en consideración aquellos materiales que no reaccionen con los polipepturos, tal como por ejemplo gelatina, lactosa, glucosa, sal común, almidón, estarato de magnesio, talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma, glicoles polialquilénicos, vaselina, colesteroína u otros vehículos medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar por ejemplo como tabletas, grageas, polvos, cremas, ungüentos, supositorios, o en forma líquida como soluciones, suspensiones o emulsiones. En caso dado estarán esterilizados y/o contendrán materiales auxiliares tales como medios de conservación estabilización, reticulación o emulsión.

Asimismo pueden contener otros materiales

258133



terapéuticamente valiosos.

La invención se describe en los siguientes ejemplos. Las temperaturas están indicadas en grados Celsius.

Ejemplo 1

5. Ester de carbobenzoxi-glicina-p-nitrobencilo.

- Una solución de 105 g (0,5 mol.) de carbobenzoxi-glicina, 103 g (0,6 mol) de cloruro p-nitrobencílico y 85 ml (0,6mol) de amina trietílica en 1000 ml de éster acético, se calienta al reflujo durante 15 horas, a continuación se enfría y se filtra del hidrocioruro de trietiloamina precipitada. El filtrado se lava, enfriando con hielo, con solución de carbonato sódico 2-n y agua, se seca y en vacío se concentra a unos 300 ml, separándose el producto de reacción en forma cristalina; una segunda fracción se obtiene mediante la ulterior concentración de la lejía madre y adición de éter, total 146 g. Después de recrystalizar de alcohol: 139 g (81%). P.F. 108-110°.
- 10.
- 15.

Ejemplo 2

Ester de glicina-p-nitrobencilo

20. 103 g (0,3 mol.) de éster de carbobenzoxi-glicina-p-nitrobencilo (vease ejemplo 1) se disuelven en 600 ml de ácido acético glacial caliente y a 10-15° se mezclan con 215 ml de bromohidrógeno 4,2-n en ácido glacial (0,9 mol.). Al reposar a temperatura de ambiente se separa el hidrobromuro cristalino del éster de glicina-p-nitrobencilo; después de 2 horas se filtra y el cristalizado se lava con ácido acético glacial y alcohol; rendimiento 80,5 g (92 %), P.F. 197-200°. El producto se recrystaliza de metanol: P.F. 202-205°.
- 25.

258133



5. Para transformarle en el éster libre se disuelven 58 g (0,2 mol) del hidrobromuro en 100 ml de agua, se cubre con 300 ml de éster acético y a 0°, agitando, se mezcla con 50 ml de solución de carbonato potásico saturada, fría. La fase éster acética se separa y la solución acuosa, después de saturarla con carbonato potásico sólido, se vuelve a extraer 2 veces con éster acético. Las fases éster acéticas reunidas se secan y dan, después de evaporar cuidadosamente en vacío a temperatura de ambiente, 36,4g
10. (87 %) de éster de glicina-p-nitrobencilo como residuo cristalino del P.F. 50-52°, que se puede seguir elaborando directamente. Después de recrystalizar dos veces de mucho éter, el punto de fusión del material, de análisis puro, está invariable.
15. Ejemplo 3  
Ester de carbobenzoxi-L-serilo-glicina-p-nitrobencilo
20. 12 g (0,05 mol) de carbobenzoxi-L-serina y 10,5 g (0,05 mol.) de éster de glicina-p-nitrobencilo (vease ejemplo 2) se disuelven en 120 ml de cloruro metilénico y se enfría a 0°, separándose rápidamente un complejo en forma de sal de los componentes de la reacción (esta reacción se presenta en escala aumentada al emplear acetonitrilo como disolvente, algo más lentamente en formamida dimetílica). La mezcla se mezcla con una solución de 11,3 g (0,055 mol.)
25. de dicitclohexilcarbodiimida en 20 ml de cloruro metilénico y se agita durante la noche a 0°; aquí se disuelve lentamente la sal y al mismo tiempo se separa una mezcla del producto de reacción y dicitclohexilúrea que, después de agregar 0,5 ml de ácido acético glacial (para destruir el



258133

- carbodiimida en exceso), se filtra y se lava con cloruro metilénico, Para separar la dicitclohexilúrea se agita el material con 150 ml de tetrahidrofurano, la úrea sin di solver se filtra y el filtrado se evapora en vacío. Al
5. mezclar el residuo con éster acético cristaliza el produc to de reacción que, después de reposar durante la noche a 0°, se filtra. Después de recrystalizar de étanol se obtienen 15,0 g (70 %) de material puro del P.F. 121-123°
- $$[\alpha]_D^{30} = -8,5^\circ \text{ (c = 2,01 en ácido acético glacial);}$$
10. lejía madre solo da un producto amorfo, parcialmente racemizado.

- Si la reacción se efectua en formamida dimeti lica, entonces, como producto secundario, se forma aproxi madamente 15 % de carbobenzoxi-L-serilo-N,N'-dicitclohexil- urea del P.F. 170-171° (de metanol) que se separa solo con dificultad del producto principal.
- 15.

- Para la comprobación de la pureza óptica se hi driza una prueba del éster de carbobenzoxi-L-serilo-glici na-p-nitrobencilo en presencia de carbón de paladio.
20. Después de recibir la cantidad de hidrógeno calculada (5 equivalentes) muestra la L-serilo-glicina obtenida:
- $$[\alpha]_D^{26} = + 31,3^\circ \text{ (c = 3,17 en ácido clorhídrico 1-n)}$$

Ejemplo 4

Ester de L-serilo-glicina-p-nitrobencilo

25. Una solución de 43,1 g (0,1 mol) de éster de carbobenzoxi- L-serilo-glicina-p-nitrobencilo (vease ejemplo 3) en 100 ml de éster acético se mezcla con 200 ml de una solución 2-n recién preparada, a 0°, de cromohidrógeno en éster acético. Después de unos 10 minutos empieza la separación



258133

de cristales, después de 2 horas se decanta el disolvente el material cristalino se lava con éster acético, se filtra y se seca en vacío. El hidrobromuro en bruto, 30,0 g (79 %) funde a aproximadamente 140° y está lo suficientemente puro para la ulterior transformación en el éster de dipepturo libre.

5. Mediante recristalización de alcohol se obtiene el material de análisis puro del P.F. 148-150°;  $[\alpha]_D^{27} = + 12^\circ$  (c = 2,02 en agua)

10. La reacción se puede efectuar igualmente con bromohidrógeno en dioxano, pero aquí el hidrobromuro no cristaliza de la solución de reacción y por lo tanto es más difícil de aislar; con bromohidrógeno en ácido acético glacial o nitrometano se forma un material aceitoso.

15. Para transformarlo en la base libre se suspenden 29,0 g (0,077 mol) del hidrobromuro en 450 ml de cloroformo seco y a 0° se mezcla en 40 ml de una solución 2,5-n de amoníaco en metanol (aproximadamente 1,3 equivalentes). Al agitar la mezcla a 0° el material se disuelve rápidamente

20. al mismo tiempo que se separa el bromuro amónico. Después de 15 minutos se filtra, el disolvente se destila en vacío a temperatura de ambiente y el residuo cristalino se lava con éster acético frío y éter. El éster en bruto, 16,9 g (74 %), P.F. aproximadamente 85° se puede emplear directamente para ulteriores reacciones.

25.

Recristalizando dos veces de acetonitrilo se obtiene el éster del dipepturo de análisis puro del P.F. 94-96°.



25733

Ejemplo 5

Ester de carbobenzoxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicina-p-nitrobencilo.

- 26,6 g (0,1 mol) de carbobenzoxi-L-asparagina y 19,3 g (0,065 mol.) de éster de L-serilo-glicina-p-nitrobencilo, recién preparado, (vease ejemplo 4) se disuelven en 100 ml
5. de formamida dimetílica y agitando se mezcla a  $-10^{\circ}$  con una solución previamente enfriada de 20,6 g (0,1 mol) de carbodiimida dicitclohexílico en 200 ml de nitrilo acético. La mezcla de reacción se mezcla en el plazo de 10 minutos con otros 300 ml de nitrilo acético frío y se agita durante
10. 1 hora a  $-10^{\circ}$  y durante la noche a  $0^{\circ}$ . Después de agregar 0,5 ml de ácido acético glacial se filtra la mezcla precipitada del producto de reacción amorfo y la dicitclohexilurea se lava con formamida dimetílica/nitrilo acético 1:5, nitrilo acético y éter y se seca en vacío. Para separar el material de partida, eventualmente aún existente, se agita la
15. mezcla finamente pulverizada con ácido clorhídrico 1-n y a continuación con bicarbonato sódico 1-n frío, se filtra y se lava con agua y alcohol frío. El material seco se agita con 100 ml de formamida dimetílica, se filtra la
20. dicitclohexilurea insoluble, se lava con formamida dimetílica y el filtrado se concentra en vacío a unos 50 ml. Al agregar 150 ml de metanol caliente cristaliza la substancia en forma de agujas finas, P.F.  $210-212^{\circ}$   $[\alpha]_D^{27} = -12,2^{\circ}$  (c = 2,38 en ácido acético); rendimiento 15,8 g (45 %)

25. Ejemplo 6

Carbobenzoxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicina.

Una suspensión de 8,2 g (15 mMol.) de éster de carbobenzoxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicina-p-nitrobencilo (vease ejemplo 5) en 75 ml de dioxano se mezcla agitando en el plazo



330133

- de 30 minutos gota a gota con 36 ml de sosa cáustica 0,5-n (pH 11-11,2). Después de otros 15 minutos se ajusta la solución clara con ácido clorhídrico 1-n a un pH de 7 y en vacío se concentra a unos 10 ml. El material cristalino precipitado se disuelve mediante adición de 20 ml de agua y para retirar el alcohol p-nitrobencílico se extrae la solución 2 veces con éster acético y a 40° se acidifica con 15 ml de ácido clorhídrico 2-n. Al enfriar rápidamente se separa el producto de reacción en forma de agujas enmarañadas que, después de 1 hora, se filtran y se lavan neutro con agua (5,0 g. P.F. 176-178°). Después de recrystallizar de agua; 4.1 g (67 %) P.F. 185-186°  $[\alpha]_D^{20} = 8,4^\circ$  (c = 190 en ácido acético glacial).

Ejemplo 7

15. Ester metílico de carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosina.  
Una solución de 100 g (0,4 mol) de carbobenzoxi-L-prolina y 78 g de éster metílico de tirosina en 1000 ml de cloruro metilénico se mezcla a 0° con 86,5 g (0,42 mol) de dicitclohexilcarbodiimida y se deja reposar durante la noche a 0°. Después de agregar 3 ml de ácido acético glacial se filtra de la dicitclohexilúrea precipitada y el filtrado se lava enfriando con ácido clorhídrico 1-n, solución de bicarbonato sódico 1-n y agua, se seca y se evapora. El residuo da, al mezclar con éster acético, 160 g (91 %) de material cristalino del P.F. 72-74°. Después de recrystallizar 2 veces de acetona-éter el punto de fusión del material de análisis puro, está invariable,  $[\alpha]_D^{27} = -24^\circ$  (c = 4,08 en alcohol).

10 May

258133



Ejemplo 8

Carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosina

5. 149 g (0,35 mol) de éster metílico de carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosina (vease el ejemplo 7) se disuelven en 750 ml de metanol, se enfría a 0° y se mezcla con 900 ml de sosa cáustica 1-n previamente enfriada. La solución se deja reposar durante 2 horas a 0°, se ajusta con ácido clorhídrico 2-n a un valor pH de 7, en vacío se libera del metanol y a 0° se acidifica con ácido clorhídrico 2-n. El material aceitoso precipitado se recibe en éster acético, se extrae con solución de bicarbonato sódico 1-n, agregando ácido clorhídrico 2-n a 0° se precipita de la solución acuosa alcalina como aceite y nuevamente se recibe en éster acético. La solución ester acética secada da, después de evaporar en vacío, 135 g (94 %) de substancia como espuma incolora, que se puede emplear directamente para ulteriores reacciones.

Ejemplo 9

Ester metílico de carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosilo-L-ξ-tosilo-lisina.

20. Una solución de 135 g (0,33 mol) de carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosina (vease el ejemplo 8) y 109 g (0,35 mol) de ester metílico de L-ξ-tosilo-lisina en 1000 ml de acetonitrilo se mezcla, a 0°, con 72 g (0,35 mol) de dicitclohexilcarbodiimida, se deja reposar durante la noche a 0° y después de agregar 2,5 ml de ácido acético glacial se filtra de la dicitclohexilúrea precipitada. El filtrado se evapora en vacío, el residuo se recibe en 1000 ml de éster acético, la solución se lava enfriando con ácido clorhídrico 1-n solución de bicarbonato sódico 1-n y agua y en vacío se



258133

- concentra a unos 500 ml. Al reposar a 0° se separa lentamente el producto de reacción en forma amorfa (163 g. P.F. 131-133°). Después de recristalizar de metanol se obtienen 139,5 g (60 %) de material cristalino fino del P.F. 134-136°
5.  $[\alpha]_D^{28} = -47^\circ$  (c = 4,01 en alcohol).

La acetilación con anhídrido del ácido acético en piridina da el éster metílico de carbobenzoxi-L-prolilo-L-O-acetilotirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisina del P.F. 109 - 111° (de éster acético)  $[\alpha]_D^{28} = -42,3^\circ$  (c = 1,80 en etanol).

10. Ejemplo 10

Carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-L-lisina

- 7,1 g (10 mMol) de éster metílico de carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisina (vease ejemplo 9) se disuelven en 30 ml de metanol, se mezcla con 30 ml de sosa caústica
15. l-n y se deja reposar durante 2 horas a temperatura de ambiente. La elaboración de la solución de reacción se efectua en la forma indicada para la carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosina y dá, después de mezclar el producto en bruto con éter 6,9 g (98 %) de substancia como polvo amorfo, incoloro  $[\alpha]_D^{28} = -33,2^\circ$  (c = 4,76 en alcohol).
- 20.

Ejemplo 11

Ester metílico de L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisina

- 50 g (0,07 mol) de éster metílico de carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisina (vease ejemplo 9) se disuelven en 200 ml de metanol, se mezcla con 1 equivalente de una solución de clorohidrógeno en metanol y se hidriza en presencia de 1,5 g de carbón de paladio (al 10 %) a temperatura de ambiente y presión normal, con lo que el dióxido de carbono, que se forma, se absorbe en sosa caústica.
- 25.

258133



- Después de recibida la cantidad calculada de hidrógeno se para la hidrización. La solución filtrada del catalizador se evapora en vacío y el residuo, parcialmente cristalino, se frota con éster acético. Recristalizando 2 veces de metanol se obtiene el hidrocloreuro del éster tripeptúrico de análisis puro del P.F. 178-180° (al calentar rápidamente) ó 198-200° (al calentar lentamente),  $[\alpha]_D^{26} = -19,4^\circ$  (c = 2,16 en agua); rendimiento 37,0 g (87 %) Para la transformación en el éster libre se suspenden 33,5
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- g (0,055 mol) del hidrocloreuro en 350 ml de éster acético y se mezcla con 30 ml de una solución 2,5-n de amoniaco en metanol y se agita durante 30 minutos a temperatura de ambiente, con lo que el material de partida se disuelve totalmente. El bromuro amónico precipitado se filtra y el filtrado se evapora en vacío y el residuo se recibe en 100 ml de éster acético. Al reposar durante la noche a 0° se separa el éster tripeptúrico en forma cristalina; 31,3 g (99 %) P.F. 82-84°. Después se recristaliza una prueba dos veces P.F. 85-87°  $[\alpha]_D^{26} = -15,8^\circ$  (c = 5,44 en alcohol)

Tanto el hidrocloreuro como el éster libre son unitarios en la cromatografía de papel.

#### Ejemplo 12

Ester metílico de butilo terc.-oxicarbonilo-L-prolilo-L-tirosilo-L-ξ-tosilo-lisina.

- 25.
- Una solución de 31,3 g (54 mMol) de éster metílico de L-prolilo-L-tirosilo-L-ξ-tosilo-lisina recién preparado (vease ejemplo 11) en 60 ml de piridina seca se mezcla con 13,1 g (55 mMol) de carbonato butilo terc.-p-nitrofenílico y se deja reposar durante la noche a 20°. La solu

258133



- ción de reacción se concentra en vacío a un volumen pequeño, se mezcla con éster acético y enfriando con hielo se lava tres veces con ácido clorhídrico 2-n, dos veces con solución de bicarbonato sódico 1-n y con agua, se seca, y
5. se evapora en vacío. El residuo da después de frotar varias veces con éter 35,5 g (98%) de una espuma ligeramente amarillenta. La sustancia muestra ser unitaria en cromatografía de papel (después de hidrólisis del grupo butilo terciario oxycarbonílico y del grupo estérico con ácido clorhídrico
10. conc. 60 min. a 40°) y en la distribución en contracorriente seg. Craig (Sistema metanol-agua-cloroformo-tetraclorocarbono 8:2:5:5).

Ejemplo 13

L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisina

15. a) una solución de 6,11 g (10 mMol) de hidrocloreuro del éster metílico de L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisina (vease el ejemplo 11) en 40 ml de sosa cáustica 1-n se deja reposar durante 1 hora a 0° y a continuación se ajusta con ácido clorhídrico 1-n el valor pH a 5. El material precipitado se filtra y se lava con agua y alcohol; 4,67 g
20. (83 %) P.F. 222-224°. Para la ulterior limpieza se disuelve la sustancia en 20 ml de formamida dimetílica caliente, se filtra del poco material insoluble y se mezcla con 50 ml de metanol caliente con lo que se separa el N- $\xi$ -
25. tosilo-tripepturo en forma de agujas finas del P.F. 224-226°: 4,40 g (79%);  $[\alpha]_D^{27} = -16,6^{\circ}$  (c = 3,99 en formamida dimetílica),  $-36,4$  (c = 2,36 en solución de bicarbonato potásico 0,5-n); cromatografía de papel unitaria.
- b) 3,47 g (5 mMol) de carbobenzoxi-L-prolilo-L-tirosilo-

258133



5. L- $\zeta$ -tosilo-lisina (vease el ejemplo 10) se disuelven en 35 ml de metanol y se hidriza en presencia de 0,5 g de carbón de paladio (al 10%) (dióxido de carbono absorbido en sosa caústica), Después de recibir la cantidad de hidrógeno calculada se disuelve el producto de reacción precipitado mediante adición de 20 ml de agua caliente, se filtra en caliente del catalizador, el filtrado se evapora en vacío y el residuo cristalino se lava con alcohol: 1,90 g (68 %). P.F. 219-222°. Después de recrystalizar de formamida dimetílica-metanol es idéntico al material obtenido según a)
- 10.

Ejemplo 14

Butilo terc.-oxicarbonilo-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\zeta$ -tosilo-lisina.

15. 34,0 g (50 mMol) de éster metílico de butilo terc.-oxicarbonilo-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\zeta$ -tosilo-lisina (vease el ejemplo 12) se disuelven en una mezcla enfriada a 10° de 50 ml de metanol y 150 ml de sosa caústica 1-n. La mezcla de reacción se deja reposar durante 1 hora a temperatura de ambiente, con ácido clorhídrico 2-n se ajusta a un valor p<sup>H</sup> de 7, en vacío se libera del metanol, se cubre con éster acético y a 0°, agitando se acidifica con ácido clorhídrico. La fase éster acética separada se lava con agua y se extrae tres veces con solución de bicarbonato potásico 0,5-n. Después de cubrir los tractos acuosos reunidos con éster acético se vuelve a acidificar ligeramente (al congo) a 0° con ácido clorhídrico 2-n, la solución éster acética se lava con agua (hasta neutro) se seca y se evapora en vacío. La espuma que se obtiene como residuo
- 20.
25. da, después de frotar con éter, 32,2 g (96 %) de un polvo



incoloro que en cromatografía de papel (después de hidrólisis de los grupos protectores) demuestra ser unitario.

5. Para el análisis se disuelve una prueba en poco éster acético a 30°, se enfría a 0°, el aceite precipitado se decanta de la solución superpuesta y se frota con éter. La titración con sosa caústica l-n en metanol da el peso equivalente esperado de 660.

Ejemplo 15

Ester metílico de butilo terc.-oxicarbonilo-L-prolilo-L-tirosilo-L-ξ-tosilo-lisilo-L-metionina.

10. Una solución de 33,0 g (50 mMol) de butilo terc.-oxicarbonilo-L-prolilo-L-tirosilo-L-ξ-tosilo-lisina (vease ejemplo 14) y 9,0 g (55 mMol) de éster metílico de L-metionina recién preparado en 250 ml de nitrilo acético se enfría a -10° y se mezcla con 11,4 g (55 mMol) de dicitclohexilocarbodiimida. Después de 15 horas a -5° y 24 horas a 0° se agrega 1 ml de ácido acético glacial, la dicitclohexilurea precipitada se filtra y el filtrado se evapora en vacío.
15. El residuo se recibe en éster acético, enfriando con hielo se lava con ácido clorhídrico l-n, solución de bicarbonato potásico 0,5-n y agua, se seca y se evapora en vacío y el material obtenido en forma de aceite se frota con éter.
20. El polvo amorfo, amarillento (38,3 g 95 %) muestra en la comprobación de cromatografía de papel (después de la hidrólisis de los grupos protectores) aproximadamente un 10 % de impurezas, que no se pueden separar por distribución en contracorriente según Craig (sistema metanol, agua, cloroforno, tetraclorocarbono 12:3:4:8).
25. En igual forma se forman al reaccionar con éster de L-metionina-p-nitrobencilo [obtenido de éster de carbobenzoxi



5. -L-metionina-p-nitrobencilo, P.F. 62-64° [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -15°  
(c = 2,02 en acetona) por descarbobenzoxilización con  
bromohidrógeno en éster acético y transformación del  
hidrobromuro del éster de L-metionina-p-nitrobencilo, P.F.  
149-151° [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>30</sup> = + 4° (c = 1,97 en metanol) en el éster  
libre] el ester p-nitrobencílico de butilo terc.-oxicarbo  
nilo-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisilo-L-metionina  
con un rendimiento de un 96% como espuma amarillenta, que  
muestra un grado de pureza equivalente al ester metílico  
arriba descrito.
- 10.

Ejemplo 16

Butilo terc.-oxicarbonilo-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-  
lisilo-L-metionina

15. 20,1 g (25 mMol) de éster metílico de butilo terc.-oxicarbo  
nilo-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisilo-L-metionina  
(vease el ejemplo 15) se disuelven en 40 ml de metanol, a  
unos 10° se mezclan con 75 ml de sosa cáustica l-n y se  
deja reposar durante 45 minutos a temperatura de ambiente.  
Después de elaborar en la forma descrita para la butilo  
terc.-oxicarbonilo-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisina  
20. da el producto en bruto, obtenido en forma de espuma, al  
frotar con éter, 15,4 g (78 %) de un polvo ligeramente  
amarillento que se elabora directamente. Peso equivalente  
824 (cal.791)  
El mismo producto se obtiene al saponificar el éster p-ni  
25. trobencílico correspondiente (rendimiento 83 %)

Ejemplo 17

L-prolilo-L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisilo-L-metionina

15,0 g (19 mMol) de butilo terc.-oxicarbonilo-L-prolilo-  
L-tirosilo-L- $\xi$ -tosilo-lisilo-L-metionina (vease el ejem

2-28133



5. plo 16) se disuelven en 75ml de éster acético caliente se enfría a temperatura de ambiente y agitando se vierte en 300 ml de una solución al 2,5 n de ácido clorhídrico en éster acético. Después de 1 minuto empieza la separación de un material, al principio aceitoso, después cristalizante, que se filtra después de 30 minutos y se lava con éster acético y éter. El hidrocloreuro algo hidrosκόpico (12,6 g) se disuelve en 50 ml de agua para su transformación en el derivado tetrapeptúrico libre y con hidróxido amónico se ajusta el pH a 6. El material aceitoso separado solidifica al frotar a 0° y se separa por centrifugación. Después de lavar varias veces con agua se frota el producto húmedo, amorfo con 50 ml de alcohol caliente y el material finamente cristalino se filtra después de 2 horas y se lava con alcohol. 8,9 (75 %), P.F. 208-211°. Para la ulterior limpieza se disuelve la substancia en 150 ml de formamida dimetílica caliente y se mezcla con 300 ml de metanol; el derivado tetrapeptúrico se separa rápidamente en forma de agujas finas del P.F. 229-231°, rendimiento después de aislar una segunda fracción de la lejía madre: 8,65 g (66 %)  $[\alpha]_D^{26} = -42,0^\circ \pm 0,2^\circ$  (c = 2,02 en bicarbonato potásico 0,5-n). La substancia limpiada muestra los valores analíticos esperados, contiene sin embargo aproximadamente 5 % de un producto secundario demostrable por cromatografía de papel. La misma substancia se obtiene por tratamiento de éster p-nitrobencílico de butiloxi terc.-oxicarbonilo-L-prolilo-tirosilo-L- $\alpha$ -tosilo-lisilo-L-metionina con ácido clorhídrico en éster acético (rendi
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.



258133

miento 71 %) y saponización del hidrocloreuro del ester p-nitrobencílico de la L-prolilo-L-tirosilo-L- $\epsilon$ -tosilolisilo-L-metionina (rendimiento 60 %).

Ejemplo 18

5. Carbobenzoxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\epsilon$ -tosilolisilo-L-metionina

Una solución de 1,03 g (2,5 mMol) de carbobenzoxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicina (vease el ejemplo 6) y 0,38 ml (0,28 mMol) de amina trietilica en 5 ml de formamida dimetilica

10. se enfría bajo exclusión de humedad a 10° y agitando se mezcla gota a gota en el plazo de 5 minutos con una solución de 0,35 g (2,5 mMol) de clorocarbonato isobutilico en 2 ml de tetrahidrofurano. La solución se agita durante otros 10 minutos a -10° y 20 minutos a 20° y se enfría a 0°

15. y en el plazo de 10 minutos se gotea una solución de 1,73 g (2,5 mMol) de L-prolilo-L-tirosilo-L- $\epsilon$ -tosilolisilo-L-metionina (vease el ejemplo 17) y 0,41 ml (3 mMol) de amina trietilica en 15 ml de formamida dimetilica (solución obtenida por calentamiento en un recipiente cerrado

20. a aproximadamente 20° y enfriamiento rápido). La mezcla de reacción se deja reposar durante 1 hora a 0° y durante la noche a temperatura de ambiente, después se concentra a 0,1 mm a aproximadamente 4 ml y se mezcla con 20 ml de ácido acético l-n. El material aceitoso separado se lava

25. varias veces con ácido acético l-n y agua con lo que solidifica parcialmente y se seca en vacío a temperatura de ambiente. Recristalizando dos veces de alcohol se obtienen 1,25 g (46 %) de substancia amorfa del P.F. 167-172, que contiene aproximadamente 10 % de impurezas demostrables



258133

5. por cromatografía de papel. Para la ulterior limpieza se distribuye el producto en un aparato seg Crain en el sistema metanol, agua cloroformo, tetraclorocarbono 3:1:3:1 a través de 60 pasos, cada uno con 10 ml de fase inferior respectivamente superior (máximo en G=0,63). Las fracciones punta reunidas dan después de recristalizar de metanol 0,54 g de substancia unitaria según cromatografía de papel del P.F. 175-177° (ligera sinterización a 171°)  $[\alpha]_D^{26} = -30,1^{\circ}$  (c = 2,06 en formamida dimetílica)

10. En igual forma se obtiene, al reaccionar carbobenzoxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicina (vease el ejemplo 6) con L-prolilo-L-tirosilo-L- $\zeta$ -tosilo-lisina (vease el ejemplo 13) la carbobenzoxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\zeta$ -tosilo-lisina que, después de recristalizar dos veces de alcohol, da la substancia pura según cromatografía de papel del P.F. 138-143° (ligera sinterización a 133°)  $[\alpha]_D = 31,1^{\circ}$  (c = 2,16 en formamida dimetílica). La descarbobenzoxilización hidrogenolítica de la L-asparaginilo-L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo-L- $\zeta$ -tosilo-lisina. Después de recristalizar de formamida dimetílica-metanol tiene el punto de fusión 192-196° (Coloración marrón a partir de 180°)

15. Ejemplo 19  
Ester dimetílico del ácido N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-N- $\zeta$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico.  
25. 45,0 g (0,28 mol) de ester dimetílico de ácido L-asparagínico y 126 g (0,29 mol) de N<sup>ε</sup>-carbobenciloxi-N- $\zeta$ -tosilo-L-lisina se disuelven en 1,5 litros de acetonitrilo. La solución enfriada a -15° se mezcla con 60,0 g (0,29 mol) de dicitclohexilcarbodiimida y después se deja reposar



258133

- durante 30 minutos a  $-15^{\circ}$  y 48 horas a  $3^{\circ}$ . La pasta de cristal precipitada (mezcla del éster dimetílico de dipepturo con dicitclohexilurea) se filtra en vacío (303,5 g) ulterior elaboración vease abajo). El filtrado se mezcla con 2 ml de ácido acético glacial y se deja durante otras 2 horas a  $3^{\circ}$ , a continuación se evapora y el residuo se recibe en éster acético. Después de lavar con ácido clorhídrico diluido, agua, solución de bicarbonato sódico y agua, secar y evaporar se obtienen 35,0 g de residuo
5. La cristalización de éster acético da 11,8 g del compuesto de arriba del P.F. ( $130^{\circ}$ )  $137-140^{\circ}$ . Al cromatografiar la lejía madre de estos cristales en óxido de aluminio se obtiene un producto secundario del P.F.  $122-124^{\circ}$ , se trata de la 1-(N<sup>α</sup>-carbocenciloxi-N-ξ-tosilo-L-lisilo)-1,3 dicitclo-hexilurea.
- 10.
- 15.

La mezcla precipitada de la solución de reacción del éster dipeptúrico, y dicitclohexilurea de arriba (203,5 g) se frota con cloroformo frío y la urea sin disolver se filtra en vacío (57,5 g P.F.  $222-225^{\circ}$ ). El filtrado se evapora y el residuo se cristaliza de metanol con lo que se obtienen 136,8 g de éster dimetílico del ácido N<sup>α</sup>-carbocenciloxi-N-ξ-tosilo-L-lisilo-L-asparagínico, P.F. ( $140$ )  $144-146^{\circ}$ . Rendimiento total; 148,6 g (92 % de la teoría).

20.

La recrystalización de éster acético, después de metanol da el producto de análisis puro del P.F.

25.

$$144-146^{\circ} [\alpha]_D = + 27^{\circ} \pm 0,6^{\circ} \quad (c = 1,11 \text{ en cloroformo})$$



Ejemplo 20

258133

Ester dimetílico del ácido N- $\zeta$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico.

- 50,0 g ( 0,087 mol) de éster dimetílico del ácido N<sup>α</sup>-carbobenciloxi-N- $\zeta$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico (vease ejemplo 19) se disuelven bajo exclusión de humedad en 200 ml de ácido acético glacial abs., se mezcla con 90 ml de solución de bromohidrógeno 4,2-n en ácido acético glacial y a temperatura de ambiente se deja hasta terminar el desarrollo de gas (2 1/2 horas). La solución de reacción se evapora entonces a 0,1 Torr y 35° de temperatura del baño hasta secar y el residuo se frota, enfriando con hielo, con éster acético hasta que cristalice totalmente. Se Obtienen así 44,37 g (97 % de la teoría) de hidrobromuro de éster metílico del ácido N- $\zeta$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico cristalino en bruto del P.F. (140°) 142-146°. El producto está suficientemente puro para ulteriores reacciones. Recristalizando dos veces de metanol-éter se obtiene el material de análisis puro del P.F. 144-146° [ $\alpha$ ] = + 7,0°  $\pm$  0,3° (c = 2,14 en metanol)
20. 44,0 g (0,084 mol) de hidrobromuro del éster dimetílico del ácido N- $\zeta$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico se disuelven en 120 ml de agua, la solución se filtra hasta estar clara, se mezcla con mucho cloroformo y enfriando con hielo se pone fuertemente alcalina con solución de potasa concentrada fría. El ester dipeptúrico libre, que se separa en forma de aceite, se recibe en cloroformo, la solución clorofórmica se lava dos veces con una solución de sulfato sódico fría, se seca y se evapora. Se obtienen así 33,0 g (89 %) de ester dimetílico del ácido N- $\zeta$ -



-tosilo-L-lisilo-L-asparagínico como aceite claro viscoso e inmediatamente se sigue elaborando como descrito más abajo.

Ejemplo 21

5. Ester dimetílico del ácido N-carbobenciloxi-L-prolilo-N- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico.

En una solución enfriada a  $-15^{\circ}$  de 33,0 g (0,075 mol) de ester dimetílico del ácido N- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico (vease ejemplo 20) y 20,4 g (0,082 mol) de N-carbobenciloxi-L-prolina en 500 ml de acetonitrilo se agregan 17,0 g (0,082 mol) de díciclohexilcarbodiimida. Después de 30 minutos a  $-15^{\circ}$  y 20 horas a  $3^{\circ}$  se filtra en vacío la díciclohexilurea (16,4 g, P.F. 223-226 $^{\circ}$ ) y el filtrado se deja después de agregar 2 ml de ácido acético glacial durante otras dos horas a  $3^{\circ}$ . De esta manera se separan aún 0,98 g de díciclohexilurea. El filtrado se evapora, el residuo se disuelve en éster acético y la solución se lava con ácido clorhídrico diluido, agua, solución de bicarbonato de sosa y agua, se seca y se evapora. El residuo (50,0 g) se frota varias veces con mucho éter (elaboración de las partes solubles en éter (8,0 g de resina) vease más abajo). El material insoluble en éter (41,7) da, después de reposar largo tiempo en metanol-agua, 35,0 g de éster dimetílico del ácido N-carbobenciloxi-L-prolilo-N- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico en forma de agujas. P.F. (96 $^{\circ}$ ) 110-113 $^{\circ}$ . Al recrystalizar de acetona-éter y metanol se obtiene un producto de análisis puro del P.F. 126-129 $^{\circ}$   $[\alpha]_D^{25} = -22,6^{\circ} \pm 0,8^{\circ}$  (c = 1,02 en cloroformo).

Las lejías madre del cristalizado en bruto (35,0 g) se

258



reunen con el material de arriba (8,0 g) soluble en éter total 13,2 g y se cromatografía en 50 veces su cantidad en peso de silicagel. Las fracciones eluadas son cloroformo-etanol dan aún 7,0 g de éster tripeptúrico cristalino del P.F. aproximadamente 120-126°

5. En total se obtienen 42,0 g (83 %) del derivado tripeptúrico cristalino.

Ejemplo 22

Diamida del ácido N-carbobenciloxi-L-prolilo-N-ε-tosilo-L-lisilo-L-asparagínico

10. El derivado tripeptúrico del ejemplo 21 se deja con mucho amoníaco en exceso en metanol durante 48 horas a temperatura de ambiente. Evaporando y cristalizando de metanol se obtiene en un rendimiento del 85% la diamida del ácido N-carbobenciloxi-L-prolilo-N-ε-tosilo-L-lisilo-L-asparagínico, P.F. 196-202° [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -20,8° ± 0,7° (c = 1,30 en formamida dimetílica.)
- 15.

Ejemplo 23.

Ester dimetílico del ácido L-prolilo-N-ε-tosilo-L-lisilo-L-asparagínico.

20. 2,00 g (22,97 mol) de éster dimetílico del ácido N-carbobenciloxi-L-prolilo-N-ε-tosilo-L-lisilo-L-asparagínico (vease ejemplo 21) se disuelven en 25 ml de metanol, se agregan 2 ml de solución 2-n de ácido clorhídrico en metanol y la solución se hidriza en presencia de 100 mg de carbón de paladio (10 % Pd) a temperatura de ambiente y presión normal. (El dióxido carbónico desarrollado se absorbe simultáneamente en sosa caústica.)
25. La hidrización se para después de recibir algo menos de la cantidad de hidrógeno calculada después de 5 horas. Filtrando el catalizador y evaporando da el hidrocloruro del éster dimetílico del tripepturo de arriba (1,66 g) como resina incolora. Para



230133

la transformación en la base libre se disuelve el hidroclo-  
ruro en poca agua, la solución clara acuosa se cubre con  
mucho éster acético y enfriando a aproximadamente 5° se  
pone fuertemente alcalina mediante adición de solución

5. de potasa concentrada fría. El producto de reacción se sepa-  
ra así, en forma, aceitosa y se disuelve al agitar en éster  
acético. La solución éster acética se lava con solución de  
sulfato sódico fría, se seca y se evapora. El éster dimetí-  
lico del ácido L-prolilo-N- $\xi$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagíni-  
co obtenido como resina incolora (1,27 g) se sigue reaccio-  
nando directamente)
- 10.

Ejemplo 24

Diamida del ácido L-prolilo-N- $\xi$ -tosilo-L-lisilo-L-aspara-  
gínico

15. El diamida del ácido N-carbobenciloxi-L-prolilo-N- $\xi$ -tosilo-  
L-lisilo-L-asparagínico descrito en el ejemplo 22 da, bajo  
las mismas condiciones de hidrización indicadas en el ejem-  
plo 23, el hidrocioruro del diamida del ácido L-prolilo-  
N- $\xi$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico P.F. 236-238° (de agua  
acetona)  $[\alpha]_D^{25} = -37,9^{\circ} \pm 1,2^{\circ}$  ( c = 1,08 en agua) Del  
20. hidrocioruro se prepara la base libre mediante distribución  
entre n-butanol y solución de sosa 2-n. La solución butanó-  
lica da después de evaporar y frotar el residuo con eter el  
diamida del ácido L-prolilo-N- $\xi$ -tosilo-L-lisilo-L-aspara-  
gínico como polvo incoloro del P.F. 117-135°  $[\alpha]_D^{25} = -40,4^{\circ}$   
25.  $\pm 0,6^{\circ}$  ( c = 1,09 en agua)

Ejemplo 25

Ester dimetílico del ácido N-carbobenciloxi-L-prolilo-L-  
prolilo-N- $\xi$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico.

A una solución de 20,50 g (0,038 mol) de éster dimetílico

2-3133



5. del ácido L-prolilo-N- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico (vease ejemplo 23) y 11,35 g (0,0455 mol) de N-carbobenci loxi-L-prolina en 300 ml de acetonitrilo a -15° se agregan 9,40 g de díciclohexilcarbodiimida (0,0455 mol). A conti nuación se deja la solución de reacción durante 1 hora a -15° y 24 horas a 3°. Después de filtrar la díciclohexilu rea (7,77 g 90% de la teoría) se mezcla el filtrado con 1,1 de ácido acético glacial y se deja durante 1 hora a 3°. Se separan así otros 100 mg de urea. El filtrado se 10. evapora, el residuo se recibe en éster acético y se lava como siempre, neutro. La solución ester acética da, des pués de evaporar, 28,44 g de residuo (resina), El producto en bruto se frota varias veces con mucho eter y la parte insoluble en eter (24,29 g) se somete a una distribución 15. de contracorriente. La distribución de 78 escalones entre 80 % metanol y cloroformo-tetraclorocarbono 1:1 da 17,0 g de derivado tetrapeptúrico (índice de distribución G = 0,351) como resina incolora;  $[\alpha]_D^{20} = -70,6^{\circ} \pm 1^{\circ}$  (c = 2,09 en metanol).

20. Ejemplo 26

Ester dimetílico del ácido L-prolilo-L-prolilo-N- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico.

25. 10,00 g (12,95 mMol) de éster dimetílico del ácido N-carbo benciloxi-L-prolilo-L-prolilo-N- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-aspa ragínico (vease ejemplo 25) se disuelven en 200 ml de me tanol, se agregan 10 ml de ácido clorhídrico metanólico 2-n y la solución se hidriza en presencia de 500 mg de carbón de paladio (10 % Pd) a temperatura de ambiente y presión normal (empleando un segundo recipiente de hidriza ción llenado con sosa cáustica para la absorción del dió



254133  
xido carbónico desarrollado.) Después de recibir la cantidad de hidrógeno calculada se filtra la solución del catalizador y se evapora. Se forma así el hidrocloreto del éster del tripepturo de arriba como resina incolora. Se transforma como descrito en el ejemplo 23 en el éster dimetílico libre del ácido L-prolilo-L-prolilo-N- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico. Rendimiento 6,86 g (83%) El producto obtenido como resina incolora se sigue elaborando directamente.

Ejemplo 27

10. Éster dimetílico del ácido N-carbobenciloxi-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo-N- $\zeta$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico.  
6,86 g (10,8 mMol) de éster dimetílico del ácido L-prolilo-L-prolilo-N- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico (vease ejemplo 26) se disuelven en 150 ml de acetonitrilo y se agregan 2,61 g de N-carbobenciloxi-L-serina (12,0 mMol). La solución se
15. enfría a  $-15^{\circ}$ , se mezcla con 2,47 g de dicitclohexilcarbodiimida y a continuación se deja durante 1 hora a  $-15^{\circ}$  y durante 60 horas a  $3^{\circ}$ . Se filtra entonces en vacío de la dicitclohexilurea precipitada (2,33 g correspondientes a 91 % de la teoría) y el filtrado se evapora. El residuo se disuelve
20. en éster acético y como de costumbre se lava neutro. La solución éster acética da 9,06 g de residuo; éste se frota con mucho éter de petróleo después con éter. El producto en bruto insoluble en éter (8,35 g) se somete para su limpieza a una
25. distribución de contracorriente. La distribución de 48 escalones entre 80% de metanol y cloroformo-tetraclorocarbono = 1:1 da 84 % de éster pentapeptúrico puro como resina incolora (Índice de distribución G = 0,507). Después de frotar con éter muestra el producto de análisis puro el punto de fusión de aproximadamente  $70-105^{\circ}[\alpha]_D = -92,0^{\circ} \pm 0,6^{\circ}$



(c = 2,16 en metanol).

252133

Ejemplo 28

Ester dimetílico del ácido L-serilo-L-prolilo-L-prolilo-N- $\xi$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico.

5. 8,00 g (0,33 mMol) de éster dimetílico del ácido N-carboben  
ciloxi-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo-N- $\xi$ -tosilo-L-lisilo-L-  
asparagínico (vease ejemplo 27) se disuelven en 200 ml de me  
tanol, se agregan 4 ml de ácido clorhídrico metanólico 3,3-n  
y la solución se hidriza en presencia de 500 mg de carbón  
de paladio (10 % Pd) a temperatura de ambiente y presión nor  
mal (absorción de dióxido carbónico en lejía), La hidriza  
ción se termina después de 4 1/2 horas y haber recibido algo  
10. más de la cantidad de hidrógeno calculada. Filtrando del  
catalizador y evaporando se obtienen el hidrocloreuro del  
éster pentapeptúrico de arriba como resina incolora. Preci  
15. pitando varias veces de solución acetónica con éter se ob  
tienen 6,53 g de polvo amorfo. P.F. 110-150° [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = -86,7°  
± 0,7° (c = 2,41 en metanol).

20. Para preparar el éster pentapeptúrico libre se  
distribuyen 5,00 g (6,58 mMol) del hidrocloreuro de arriba  
enfriando con hielo, entre 500 ml de cloroformo y 50 ml de  
solución de sosa 2-n. El producto de reacción se disuelve  
en cloroformo. El extracto clorofórmico se lava dos veces  
con solución de sulfato sódico fría, la solución de sosa  
y de sulfato sódico se lavan con otros 200 ml de cloroformo.  
25. Las soluciones clorofórmicas reunidas dan, después de secar  
y evaporar, 4,00 g (84 %) de ester dimetílico del ácido L-  
serilo-L-prolilo-L-prolilo-N- $\xi$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagi  
nico como resina incolora que se puede seguir reaccionando  
directamente.



258133

Ejemplo 29

Hidrocioruro del éster dimetílico de ácido N-carbobenciloxi-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-asparagínico.

5. 1,36 g (1,4 mMol) de carbobenciloxi-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicina (vease sol. de patente Case 4074, ejemplo 32) se disuelven en 16 ml de formamida dimetílica recién destilada, bajo calor se vuelve a enfriar a temperatura de ambiente, se mezcla con 1,6 g de (2,1 mMol) de hidrocioruro del éster dimetílico del ácido L-serilo-L-prolilo-L-prolilo- $\epsilon$ -tosilo-L-lisina-asparagínico (vease ejemplo 28) y a continuación se agita a temperatura de ambiente. Después de agitar durante 2 horas se obtiene una solución clara. Se agregan 590 mg (2,9 mMol) de dicitclohexilcarbodiimida en 3,5 ml de formamida dimetílica y se deja reaccionar durante 3 días a temperatura de ambiente.

20. La solución liberada del dicitclohexilurea se mezcla con 500 ml de éster acético, el material precipitado se filtra a través de una frita de cristal fina y después de secar en alto vacío a 40° se obtienen 2,3 g de producto en bruto que aún está impurificado con material de partida.

25. Para su limpieza se someten 2,3 g a una distribución multiplicativa a través de 60 escalones entre las fases n-butanol: 1% ácido acético = 1:1 (G = 0,8). La cantidad principal del hidrocioruro del éster dimetílico del carbobenzoxi-undecapepturo protegido, cromatograficamente puro, se encuentra en los elementos 15 - 30. Estas fracciones se reúnen, se evaporan hasta secar y se precipitan aún 2 veces de poco formamida dimetílico con mucho éster acético.

258133

JUN 10 1961



El rendimiento es de 1,34 g (= 60 % de la teoría) de polvo amorfo, blanco[.L]<sup>25</sup> = -53,8° ± 1,8° (c = 0,9475 en formamida dimetílica).

5. En los 3 sistemas: alcohol amílico terc.: isopropanol agua = 100:40:55 butanol sec.: isopropanol: ácido monocloroacético:agua = 70:10:3g:40 butanol sec.: isopropanol:5 % veronal sódico: agua = 100:15:10:60 muestra el ester protegido los siguientes valores R<sub>f</sub> (valores medios): 0,55 resp. 0,62 resp. 0,67.

10. La determinación de ácido amínico cuantitativa según Stein y Moore en una columna de Amberlita XE-69 da la proporción de ácido amínico esperada.

Ejemplo 30

15. Trihidrocloruro del éster dimetílico del ácido L-glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicina-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo-ε-tosilo-L-lisilasaragínico.

20. 25. 1,25 g (0,72 mMol) de hidrocloreuro del éster dimetílico de carbobenzoxi-undecapepturo (vease ejemplo 29) se agitan en 70 ml de metanol que contenga 2,2 equivalentes de gas de ácido clorhídrico, en presencia de 200 mg de catalizador de carbón de paladio al 10% con hidrógeno. Para la absorción del dióxido carbónico formado se interconecta una segunda retorta de hidrización llena con lejía de potasa cáustica concentrada. Después de 6 horas ha terminado la recepción de hidrógeno. La solución metanólica se libera del catalizador, el disolvente se evapora en vacío a 40° y el residuo de evaporación se disuelve y precipita 1 vez de metanol abs./eter.

Después de secar se obtienen 1,19 g de trihidrocloruro del éster del undecapepturo amorfo ligeramente



258133

teñido de rosa.

El compuesto muestra en los tres sistemas de cromatografía descritos en el ejemplo 29 solo una mancha pauli y ninhidrin-positiva con los siguientes valores  $R_f$  (valores medios) 0,57 resp. 0,68 resp. 0,71.

5.

Ejemplo 31

Hidrocloruro del ester dimetílico del ácido L-carbobenciloxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-metionilo-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo-( $\zeta$ -tosilo)-L-lisilo-asparagínico.

10.

210 mg (0,128 mMol) de trihidrocloruro de ester dimetílico de un decapepturo (vease ejemplo 30) se disuelven en 2 ml de formamida dimetílica recién destilada, a 0° se mezcla con 0,28 ml de solución l-n de amina trietílica en formamida dimetílica y se deja durante 2 horas a 0°. Lentamente se

15.

separa el hidrocloruro trietíloamínico. Después de unos 90 minutos ha terminado la separación de sal. Entonces se agregan 152 mg (0,14 mMol) de carbobenzoxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicina-L-prolilo-L-tirosilo- $\epsilon$ -tosilo-L-lisilo-L-metionina (vease ejemplo 18) y después de otros 15 minu

20.

tos 0,21 ml de una solución l-n de dicitclohexilcarbodiimida en formamida dimetílica. Se deja reaccionar durante 3 días a 0° y durante 1 día a temperatura de ambiente, a continuación se filtra de la dicitclohexilurea separada y se precipita con 60 ml de éster acético.

25.

Después de secar en alto vacío a 40° se obtienen 290 mg de polvo blanco amorfo.

La cromatografía de papel muestra además del hidrocloruro del ester dimetílico de ácido L-carbobenciloxi-L-asparaginilo-L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo-



133

5.  $\epsilon$ -Tosilo-L-lisilo-L-metionilo-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo- ( $\epsilon$ -tosilo)-L-lisilo-asparagínico aún considerables cantidades de material inicial, Para limpiar se cromatografían 360 mg de material en bruto (de 2 preparados iguales) en una columna de celulosa ( $\varnothing$  2,5 cm. l = 90 cm) con n-butanol, saturada con 1 % de ácido acético.

10. La velocidad de elución es de 3 - 4 ml por 20 minutos. Las fracciones 81-175 muestran una reacción pauli-positivas.

15. Se reúnen las fracciones 82-84, 85-93, 94-122, 123-132 y 133-175. Las fracciones 85-03 se componen de una mezcla de carbobenzoxi-heptapepturo además de ester de carbobenzoxi-octadecapepturo, por el contrario las fracciones 94-122 contienen el éster de octadecapepturo puro protegido mientras que en las restantes fracciones está contenido principalmente el ester del undecapepturo.

20. Las fracciones 94-122 reunidas dan 113 mg de polvo blanco amorfo, que en la cromatografía de papel solo muestran una mancha positiva seg. Pauly y una según Ehrlich.

25. Una prueba del éster peptúrico protegido, purificado, se hidroliza con ácido clorhídrico 6-n durante 15 horas a 105° y da, después de separación electroforética y cromatografica de papel las manchas de ácido amínico ninhidrin-positivas esperadas.

#### Ejemplo 32

Acetato del ácido L-asparaginilo-L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo-L-lisilo-L-metionilo-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-serilo-L-prolilo-L-lisilo-L-asparagínico.

250133



5. 400 mg (0,15 mMol) de hidrocuro del éster metílico de octadecapepturo protegido (vease ejemplo 31) se disuelven en 8 ml de dioxano al 75 % y bajo nitrógeno se mezclan a temperatura de ambiente durante 14 minutos con 0,4 ml de solución de hidróxido de bario 0,46-n (pH 11,4). La solución de saponización se neutraliza con 1,84 ml de ácido sulfúrico 1/10-n y el disolvente se evapora bajo presión reducida a 40°.

10. El residuo de evaporación se recibe en 10 ml de dioxano al 50 %, se separa a través de una frita de cristal fina del sulfato de bario insoluble y se lava aún dos veces con 5 ml de dioxano al 50 %. Después de evaporar en vacío a 40° y secar el residuo sobre pentóxido fosfórico en vacío se obtienen 385 mg del producto saponización.

15. Estos 385 mg se disuelven en 80 ml de amoniaco líquido, secado sobre sodio y se reduce con calcio a la temperatura de ebullición del amoniaco. Después de agregar 110 mg de calcio queda la solución durante unos 10 minutos de color azul oscuro. A continuación se mezcla la mezcla de reacción con mucho bicarbonato amónico con lo que el tinte azul desaparece lentamente y la de solución de reacción se queda lechosa. El amoniaco se evapora a temperatura de ambiente y los últimos restos se retiran en alto vacío sobre ácido sulfúrico.

25. El residuo se extrae repetidas veces con solución de bicarbonato amónico 1-n (3 veces 10 ml) y 2 veces con 5 ml de agua, se filtra a través de celita, la solución acuosa clara (pH 8,4) se pone con ácido acético a un pH de 4,2 y el agua se evapora en vacío a 40°. El residuo

250433



se evapora aún 5 veces, cada una con 10 ml de agua y finalmente se sublima el acetato amónico en alto vacío a 40°.

5. Para la ulterior limpieza se distribuye el octadecapepturo en bruto entre butanol sec, y ácido tricloroacético acuoso al 0,5 % 1:1 a través de 160 escalones.

La determinación de la densidad óptica de las distintas fracciones a 277 mμ muestra la cantidad principal del octadecapepturo en los elementos 49 - 65. El coeficiente de distribución es de 0,53.

10. Las fases de los elementos de distribución 49-54, 55-60 y 61-65 se reúnen y bajo presión reducida a 40° se evaporan a un volumen pequeño. Para retirar el ácido tricloroacético se pasan las 3 fracciones, cada una a través de una columna de 10 ml de amberlita IR-4B (forma acética) y el pepturo se lava con 25 ml de agua. Las tres fracciones dan 100 mg de acetato de octadecapepturo.

15.

#### N O T A

20. 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 se hace constar que este invento corresponde a unas solicitudes de patentes presentadas

25. en Suiza nos. 73.685 de 28 de mayo de 1959 y 4434/60 de 20 de abril de 1960, 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 solicita patente de Invención por 20 años en España:



250133  
"Procedimiento para la obtención de nuevos polipepturos";  
caracterizándose por lo siguiente:

5. 1ª.- Procedimiento para la obtención de nuevos polipepturos, caracterizado porque el compuesto de la fórmula ácido L-asparaginilo-L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo-L-lisilo-L-metionilo-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-serilo-L-prolilo-L-prolilo-L-lisilo-L-asparagínico, así como el compuesto correspondiente que en lugar del resto glutamínico muestra el resto del ácido glutamínico o sus derivados se obtienen ligando los ácidos amínicos individualmente en la secuencia indicada o después de la formación previa de pequeñas unidades peptúricas según los métodos conocidos para la obtención de pepturos.

10. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque los ácidos amínicos o unidades de pepturo se ligan como sigue:

15. a) mediante reacción de la molécula del ácido amínico resp. pepturo en forma de un éster con grupo amínico libre con otra molécula del ácido amínico o pepturo que contiene un grupo amínico protegido, en presencia de un medio de condensación ó

20. b) mediante reacción de un éster del ácido amínico resp. pepturo con grupo amínico libre con un ácido amínico resp. pepturo con grupo carboxílico activado y grupo amínico protegido ó

25. c) mediante reacción de un ácido amínico resp. un pepturo con grupo carboxílico libre y grupo amínico protegido con un ácido amínico resp. un pepturo con grupo amínico activado y grupo carboxílico protegido.

258133



- 3º.- Procedimiento según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque el heptapepturo L-asparagi-  
nilo-L-serilo-glicilo-L-prolilo-L-tirosilo-L-lisilo-L-me-  
tionina con grupos amínicos protegidos o sus derivados  
5. reaccionables se liga con el undecapepturo ácido L-gluta-  
minilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-  
glicilo-L-serilo-L-prolilo-L-lisilo-L-asparagínico, cuyos  
grupos carboxílicos están funcionalmente modificados y  
cuyo grupo  $\epsilon$ -amínico del resto lisílico está protegido  
10. respecto del compuesto correspondiente que en lugar del  
resto glutamínico contenga en resto del ácido glutamí-  
co, o sus derivados reaccionables, bajo formación de una  
unión peptúrica entre el resto L-metionílico <sup>glutamínico</sup> y el resto  
glutamínico y, si se desea, se liberan los grupos carbo-  
15. xílicos del resto del ácido asparagínico y los grupos  
amínicos del resto asparagínico y de los restos lisílicos.

4º.- Procedimiento según la reivindicación 1ª,  
caracterizado porque la unión del heptapepturo con el unde-  
capepturo se efectúa en presencia de un carbodiimida.

20. 5º.- Procedimiento según las reivindicaciones  
1ª- 4ª caracterizado porque los grupos carboxílicos libres  
del ácido asparagínico se protegen por éster o grupos  
amídicos.

25. 6º.-Procedimiento según las reivindicaciones  
1ª - 5ª caracterizado porque el grupo amínico libre del  
resto asparagínico se protege por un resto reductivamente  
disociable.

7º.- Procedimiento según las reivindicaciones  
1ª - 6ª caracterizado porque el grupo  $\epsilon$ -amínico de los  
restos lisínicos se protegen por el grupo tísilico.

25813316  
25-33



89.- Procedimiento para la obtención de nuevos polipepturos; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de 38 hojas escritas a máquina por una sola cara.

5.

Madrid,

CIBA, SOCIETE ANONYME

J. GOMEZ ACEBO Y C<sup>DA</sup>  
S. R. L.