

PATENTE DE INVENCION

CIBA Case 4587/1-5.

269418



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de polipepturos nuevos".

=====

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

=====

El objeto de la invención es la obtención de un nuevo nonadecapepturo de la fórmula L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-(X)-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-lisilo-L-propilo-L-valiloglicilo-L-lisilo-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina,

5.



67118

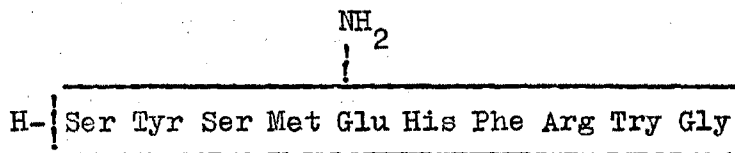
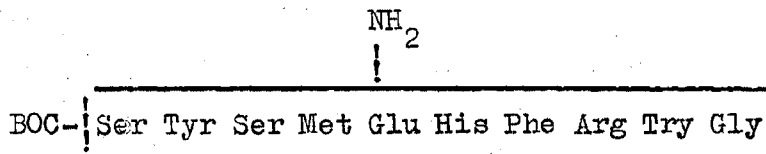
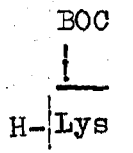
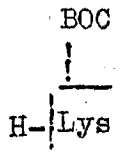
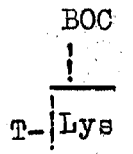
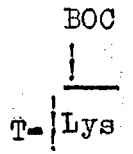
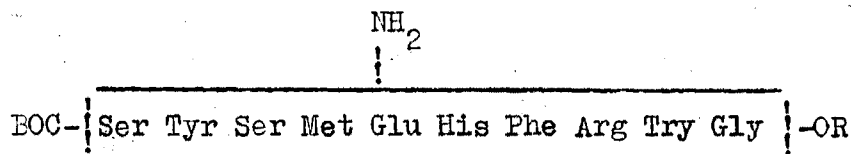
- así como al correspondiente compuesto que en lugar del resto glutamínico muestre el resto del ácido glutámico, así como de sus derivados y sales de adición de ácido. X es el resto de un ácido α -alquilo bajo- α -aminoacético.
5. en el cual el resto de alquilo bajo muestra como máximo 4 átomos de carbono y está sin sustituir o sustituido por un grupo de mercapto o alquilo bajo-mercapto, preferentemente el grupo metilomercapto, o su resto de sulfóxido o sulfono, por ejemplo, alanilo, valilo, leucilo, isoleucilo, α -amino-butirilo. cisteilo, metionilo, así como sus sulfóxidos y sulfones.
10. Bajo derivados se han de entender, ante todo, los derivados funcionales, tal como éster, amida, hidrazuro, además los productos de N-sustitución, tal como los derivados de N-acilo, especialmente N-acetilo y los compuestos que muestren los usuales grupos amino-protectores.
15. Los nuevos compuestos tienen un efecto MSH y un efecto adrenocorticotrópico muy bueno y, por lo tanto, se han de emplear como medicamentos. Además se pueden emplear como productos intermedios para la obtención de medicamentos que muestren una cadena más larga de ácido amino, tal como las mismas hormonas adrenocorticotrópicas.
20. Los nuevos nonadecapepturos se obtienen según los métodos conocidos para la obtención de los pepturos, ligándose los ácidos amino en la secuencia mencionada individualmente o después de haberse formado pequeñas unidades de pepturos. Así se puede ligar una de las moléculas del ácido amino resp. de pepturo, en forma de
- 25.
- 30.

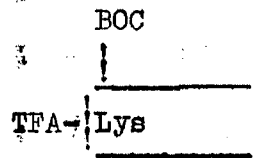
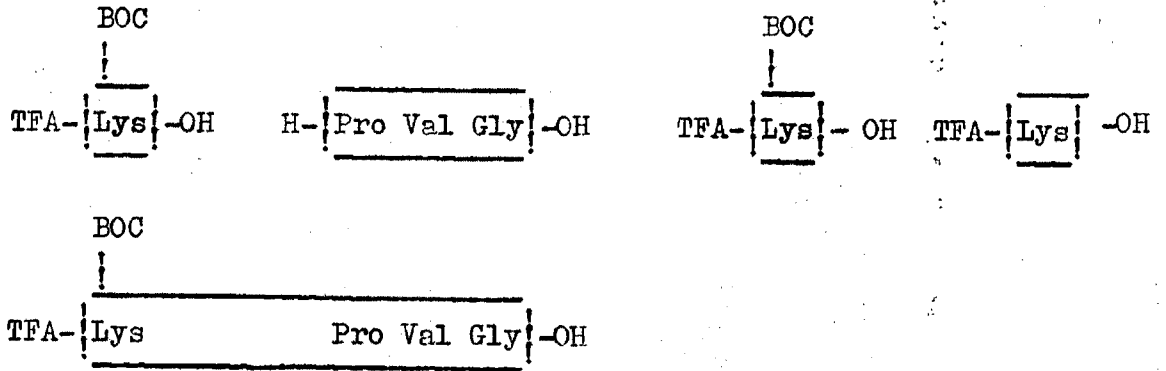


200418

- un éster, con otra molécula de ácido amínico resp. pepturo que contenga 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 resp. pepturo con grupo amínico libre se puede reaccionar un ácido amínico resp. un pepturo con grupo carboxílico activado (y grupo amínico protegido), por ejemplo, un halogenuro, azuro, anhídrido, imidazoluro de ácido o un éster activado, tal como éster cianmetílico o éster carboximetiltiólico. A la inversa, también se puede reaccionar 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), por ejemplo, un amida fosfítica. Todos los métodos mencionados son aplicables para la ligazón de los compuestos de pepturo que entran en consideración, pero los procedimientos mencionados en los ejemplos son especialmente ventajosos.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- Como ya se ha indicado, existen varias posibilidades respecto a la síntesis del nonadecapepturo de los ácidos amínicos resp. pequeñas unidades de pepturo. Un procedimiento consiste por ejemplo en que el decapepturo L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-(X)-L-glutaminilo-(ó glutamilo)-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicina se condense con el nonapepturo L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-L-lisilo-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina tal y como se muestra por ejemplo en el esquema Fig. 1 para el compuesto que, como 4º ácido aminocarbónico, contiene L-metionina y como 5º ácido
- 25.
- 30.





6 Piv



269418

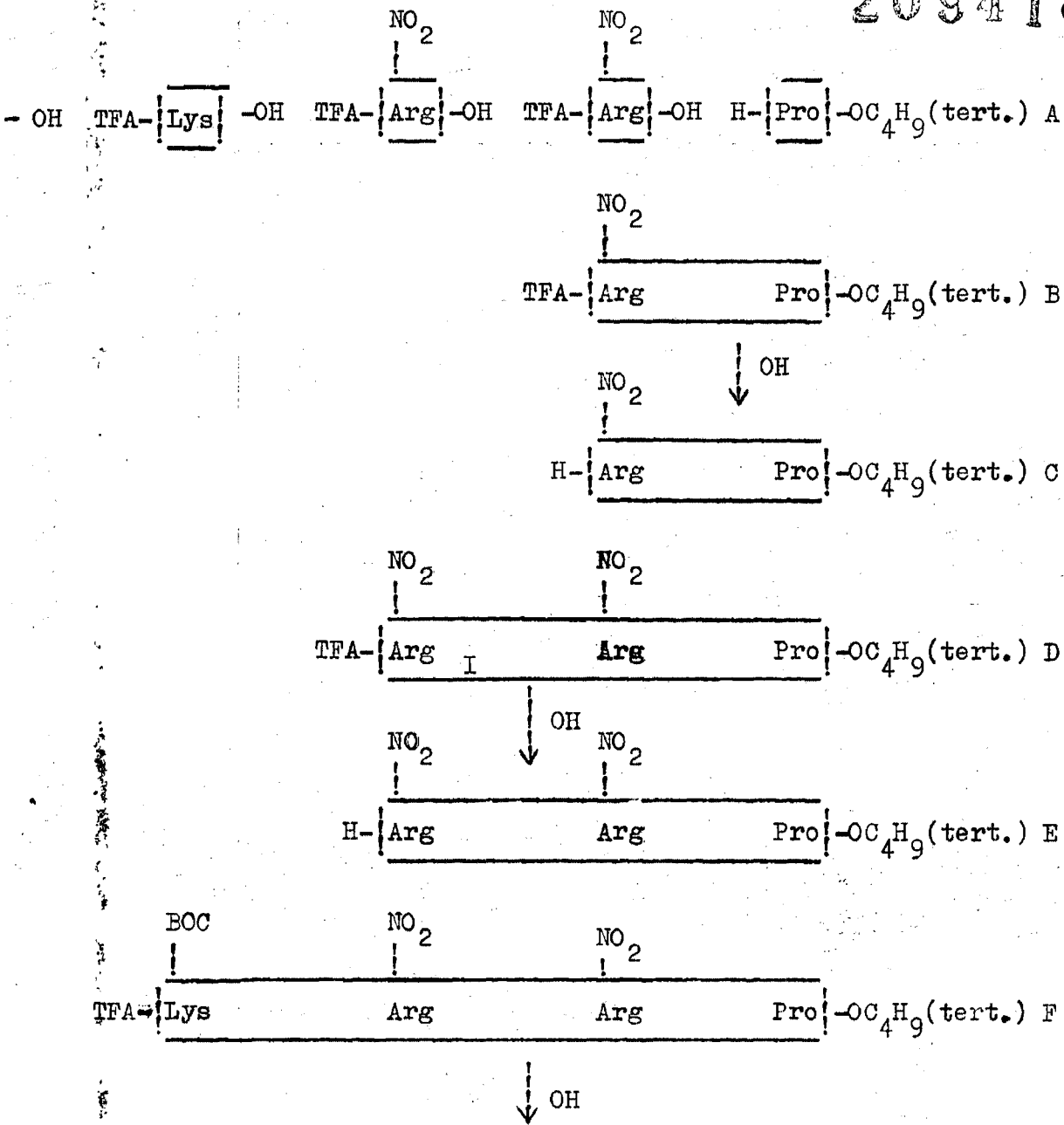


Fig. 2

Pls. 2

H-Lys	Pro Val Gly	Lys	Lys	Lys
BOC		BOC	BOC	BOC

H-Lys	Pro Val Gly	Lys	Lys	Lys
BOC		BOC	BOC	BOC

↑

TEA-Lys	Pro Val Gly	Lys	Lys	Lys
BOC		BOC	BOC	BOC

H-Lys	Lys	Lys
BOC	BOC	BOC

↑

TEA-Lys	Lys	Lys
BOC	BOC	BOC

H-Lys	Lys
BOC	BOC



ys	Lys	Arg	Arg	Pro	-OC ⁴ H ⁹ (tert.) M
OC	BOC				
ys	Lys	Arg	Arg	Pro	-OC ⁴ H ⁹ (tert.) L
OC	BOC	OH	NO ₂	NO ₂	
ys	Lys	Arg	Arg	Pro	-OC ⁴ H ⁹ (tert.) K
OC	BOC				
ys	Lys	Arg	Arg	Pro	-OC ⁴ H ⁹ (tert.) I
OC	BOC	OH	NO ₂	NO ₂	
ys	Lys	Arg	Arg	Pro	-OC ⁴ H ⁹ (tert.) H
OC	BOC				
H-Lys	BOC	NO ₂	Arg	Pro	-OC ⁴ H ⁹ (tert.) G
		OH	NO ₂	NO ₂	

269418



7 pm



- El nonadecapepturo se obtiene además si el tetrapepturo, compuesto de los cuatro primeros ácidos amínicos, se condensa con el pentadecapepturo compuesto de los siguientes 15 ácidos amínicos, por ejemplo según el esquema del la Fig. 3 y Fig. 4. El derivado del tetrapepturo BOC-Ser-Tyr-Ser-Met-NH-NH₂, empleado como material de partida, se puede obtener según el procedimiento de la solicitud de patente belga nº 481 450 (Case 4556/1+2), así como los tetrapepturos en los cuales X significa otro ácido amínico que la metionina. El derivado hexapeptúrico H-Glu(NH₂)-His-Phe-Arg-Try-Gly-OH está descrito en la patente belga nº 580 297 (Case 4074/1+2), el derivado tetrapeptúrico H-Phe-Arg(NO₂)-Try-Gly-OCH₃ en la patente belga nº 601 167 (Case 4497/1-4).
- 5.
- 10.
- 15.

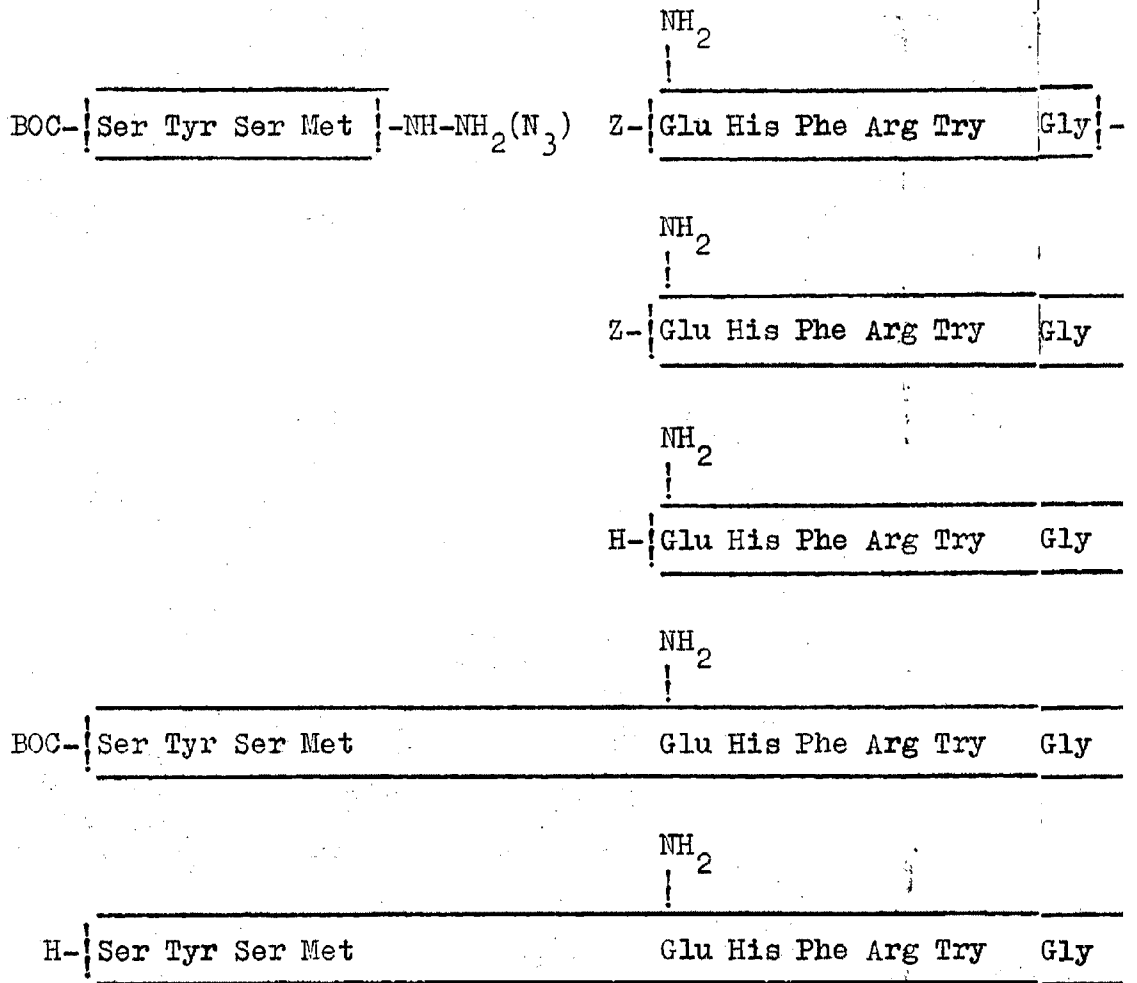


Fig. 3

9 Bis



269413

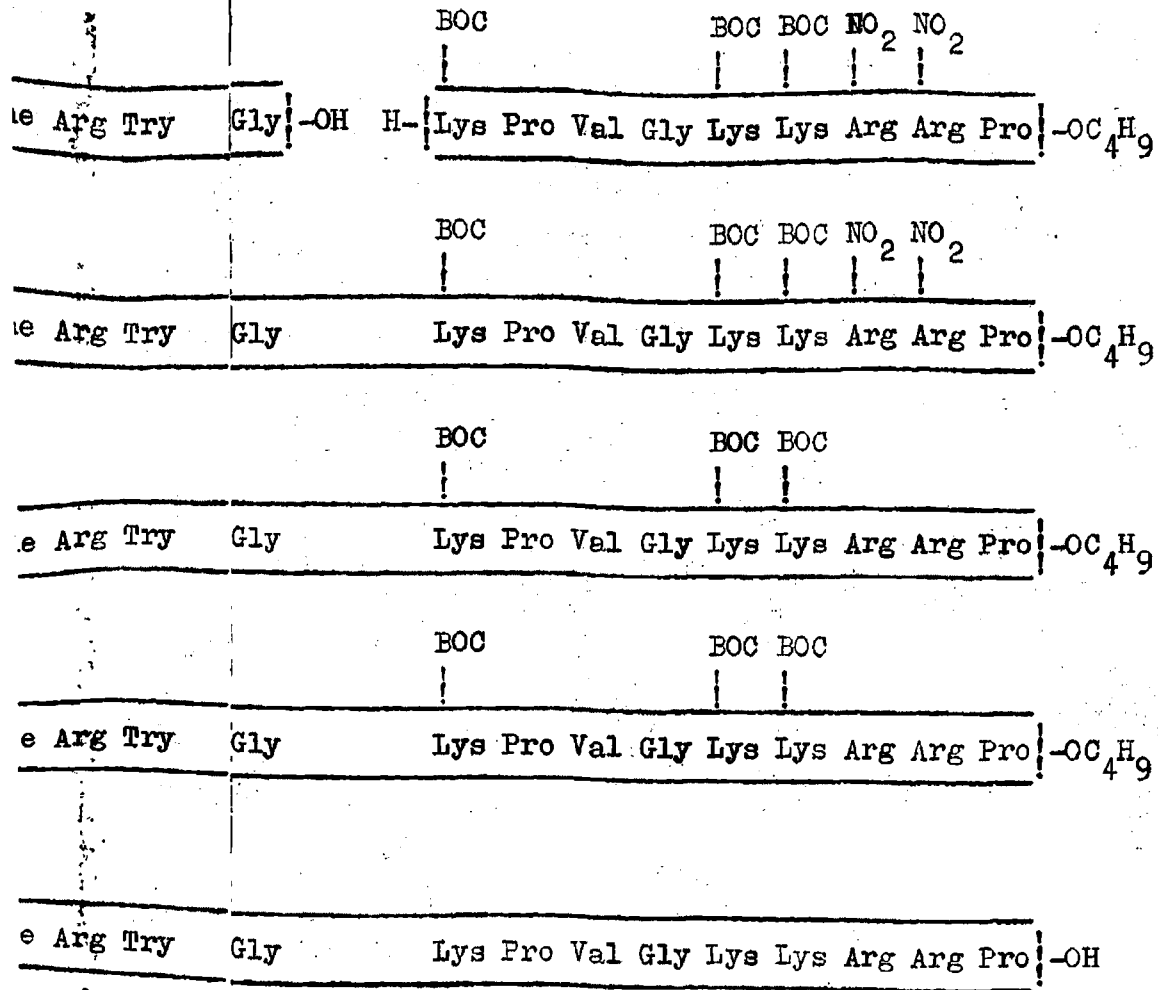


Fig. 3

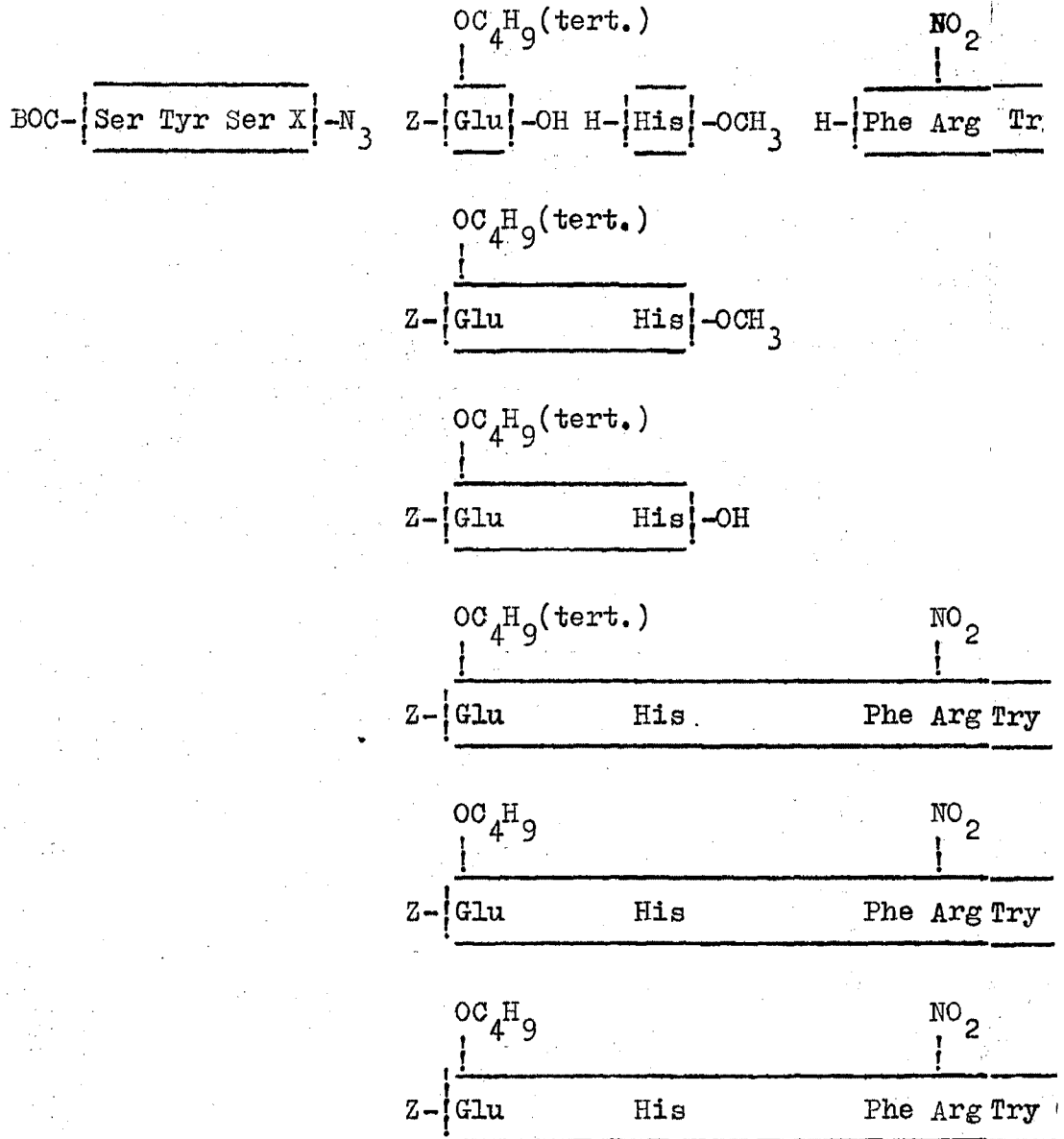


Fig.

10 Bis



269418

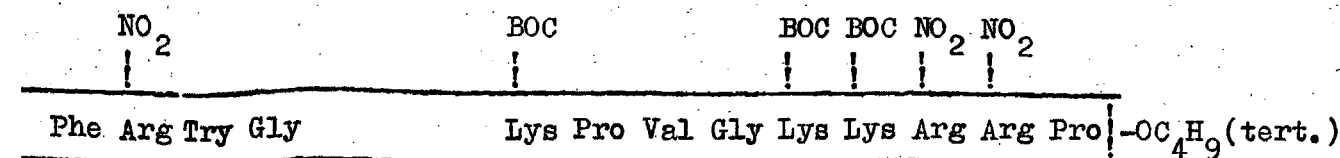
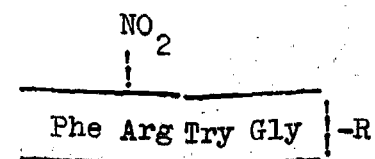
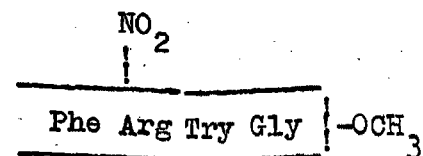
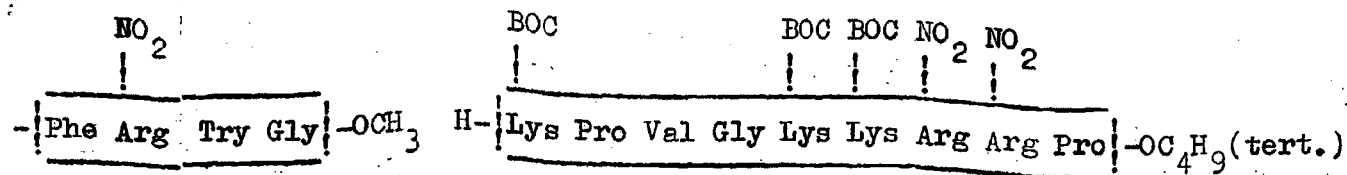
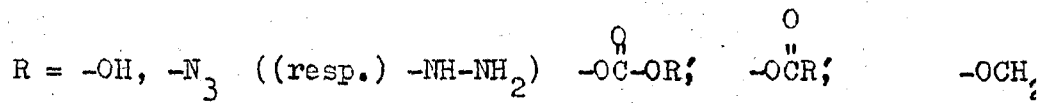
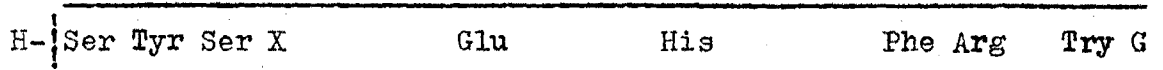
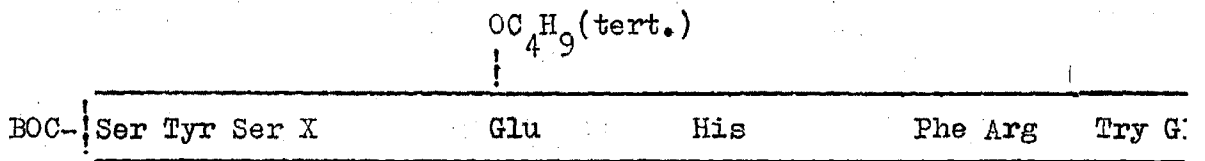
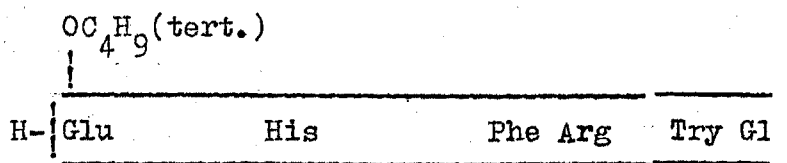


Fig. 4



R' = (alquilo bajo) El = (Sustituyente atraedor de e:

Fig.



269418

- Al emplear ácido L-glutámico como 5º ácido amínico (véase Fig. 4) ha demostrado ser conveniente proteger el grupo γ -carboxílico por el resto de butilo terc., ya que el éster de butilo terc. es considerablemente más estable contra la saponización alcalina que por ejemplo el éster metílico, etílico, bencílico o p-nitrobencílico, de manera que estos grupos de éster se pueden saponizar selectivamente en forma alcalina.
- 5.
10. Además se puede condensar un tripepturo de la fórmula L-serilo-L-tirosilo-L-serina con el hexadecapepturo formado por los siguientes 16 ácidos amínicos, por ejemplo según el esquema de la Fig. 5. El derivado trifluoroacetílico del heptapepturo empleado como material
15. de partida se puede obtener del heptapepturo libre descrito en la patente nº 601 167 (Case 4497/1-4) mediante reacción con éste fenílico del ácido trifluoroacético; el hidrazuro tetrapeptúrico está descrito en la solicitud de patente belga nº 481 450 (Case 4556/1+2).

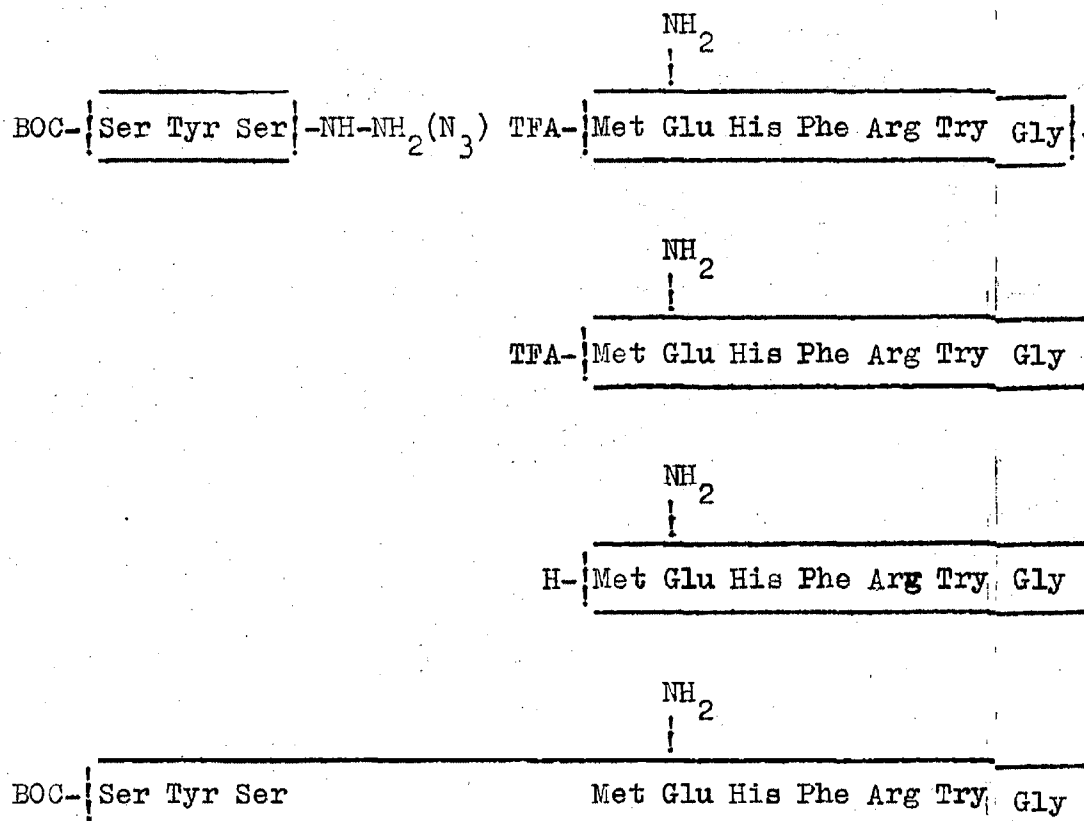


Fig.

13 Bis



269418

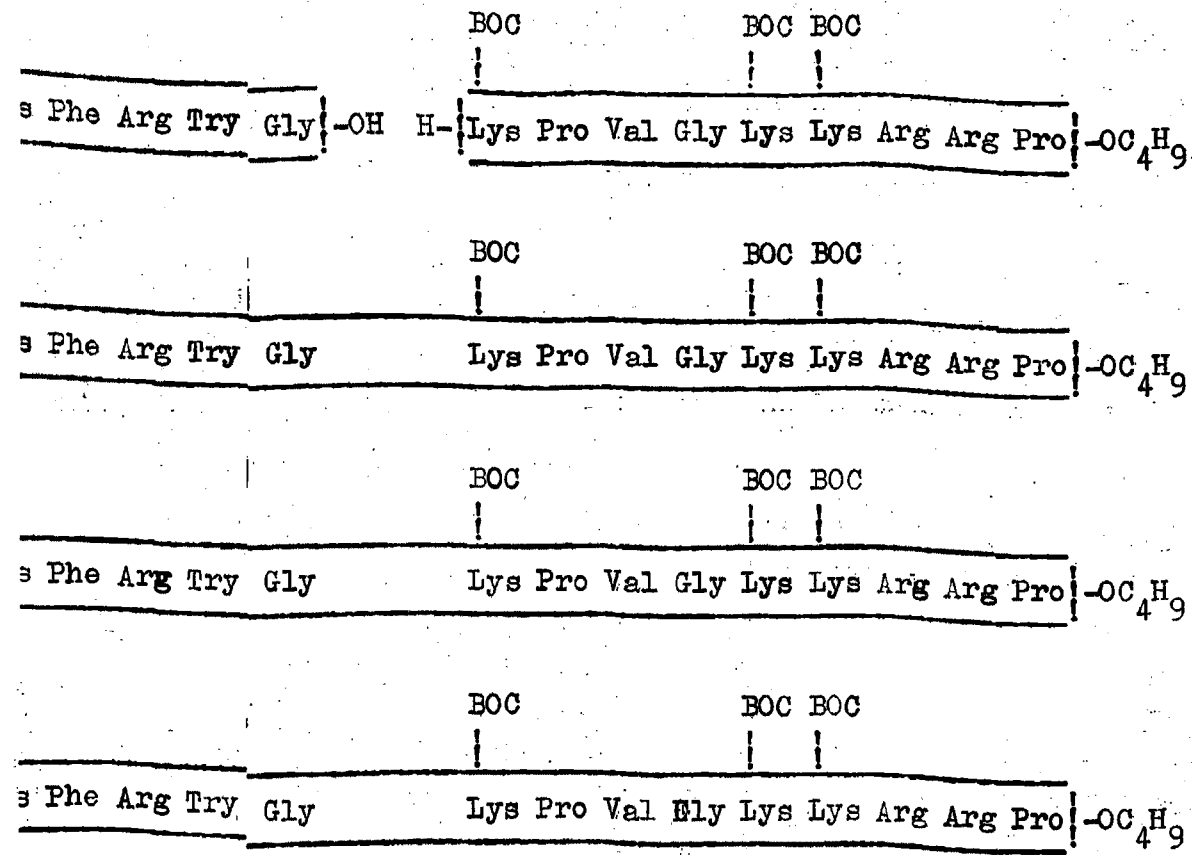


Fig. 5

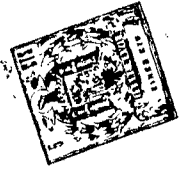


269418

Otro procedimiento consiste en condensar el tetradecapepturo, formado de 14 primeros ácidos amínicos, con el pentapepturo de los siguientes ácidos amínicos, por ejemplo según el esquema de la Fig. 6.

5. El derivado tetrapeptúrico empleado como material inicial se puede obtener de la N^α -p-fenilazobenciloxi-carbonil-N^ε -butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-pro-lilo-L-valilo-glicina descrita en la patente belga nº 594 338 (Case 4351/1-3) mediante disociación
10. hidrogenolítica del grupo protector N^α.

15 Bis



269418

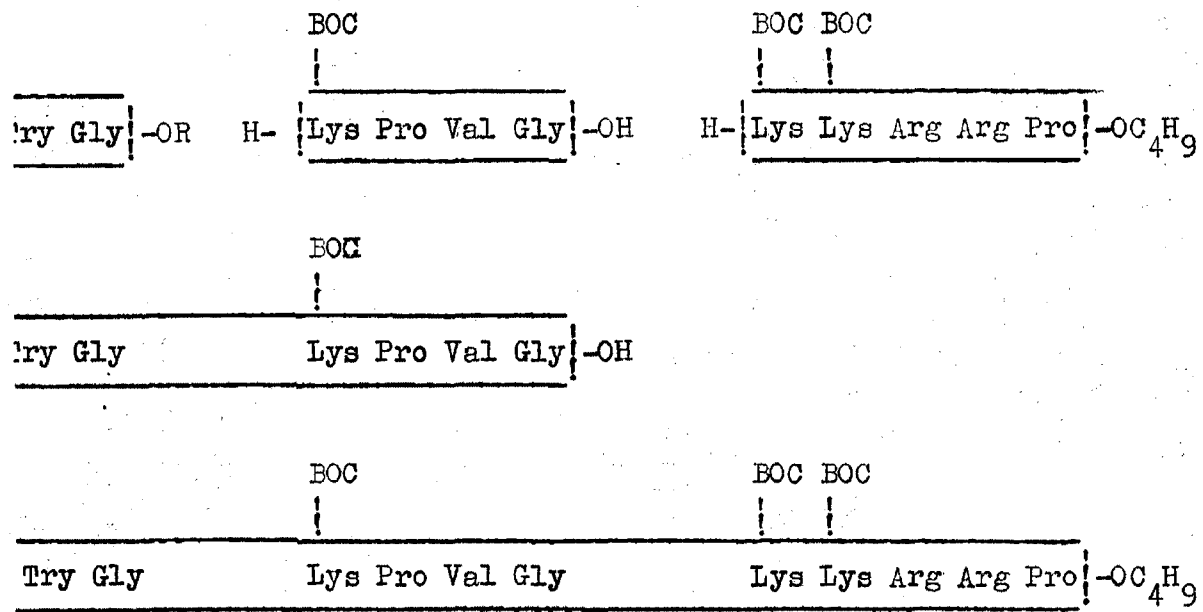
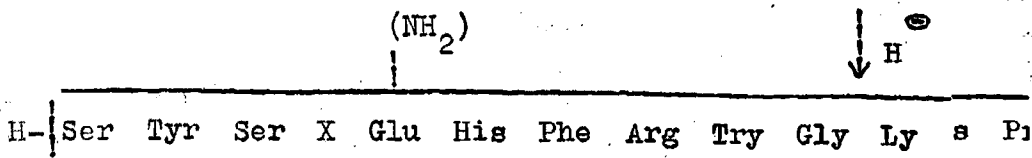
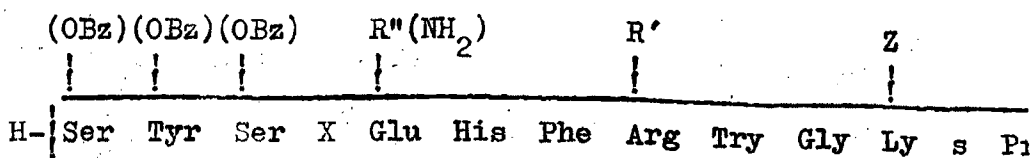
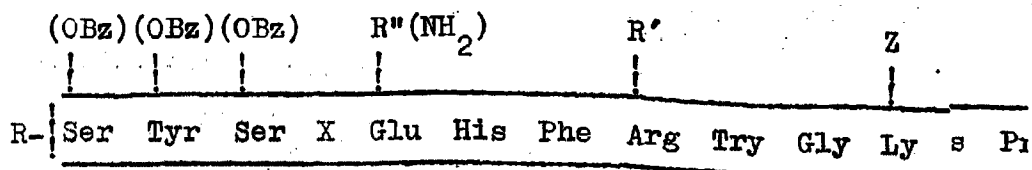
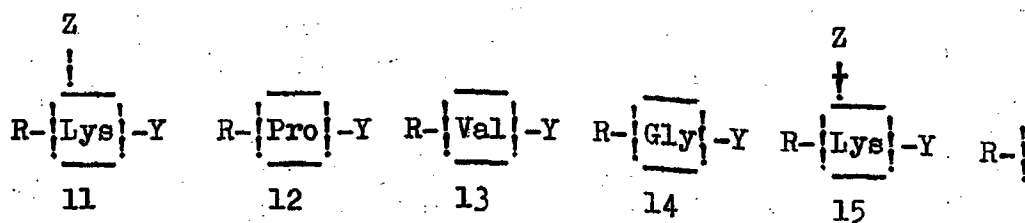
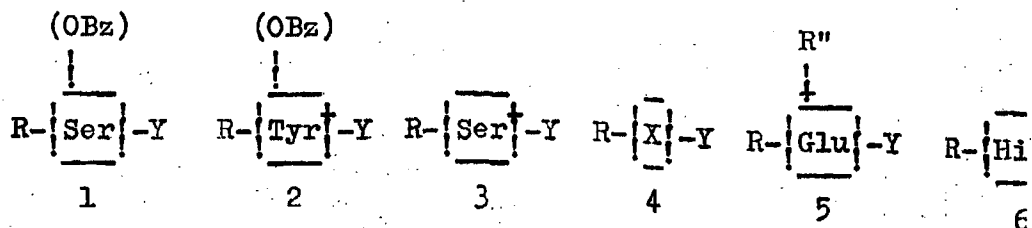


Fig. 6



269418

- En el caso de X esté por otro ácido amínico distinto a la metionina (por ejemplo uno transformable en metionina, tal como sulfóxido metionínico) se obtiene el nonadecapepturo, además, según el esquema de la Fig. 7 mediante síntesis por etapas de los distintos ácidos amínicos, partiendo del extremo carboxílico, empleando los derivados mencionados.
- 5.

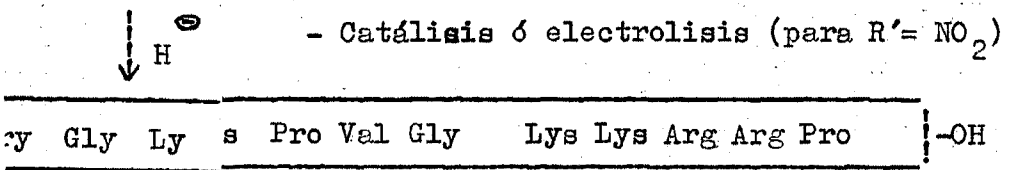
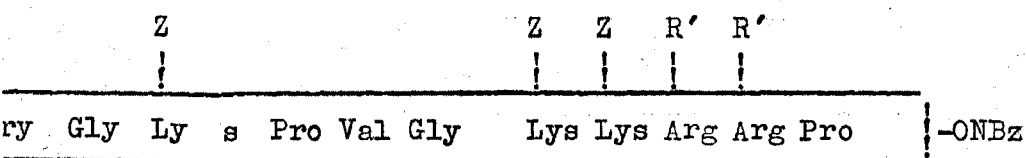
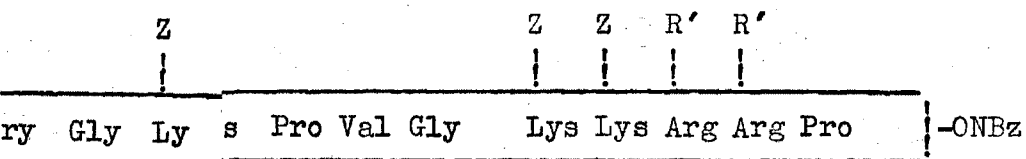
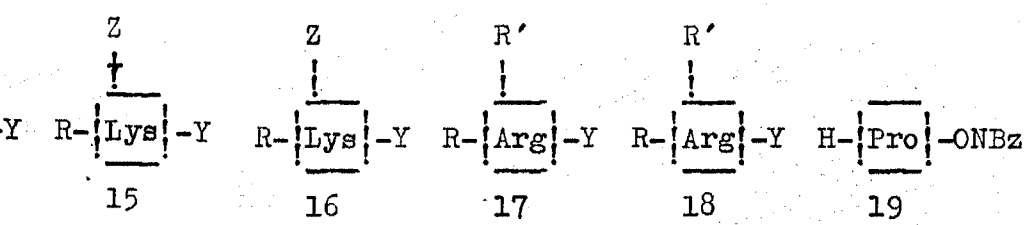
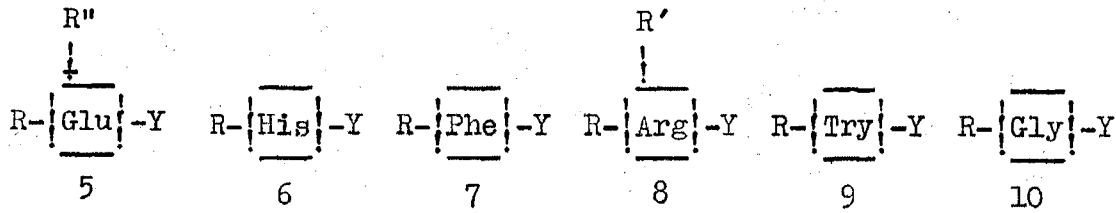


Bz = bencilo, NBz = p-nitrobencilo, R' = -NO₂ ó
 BOC, p-metoxi-carbobenzoxi, o Ftalilo (en e
 Y = -OH, anhídruo mixto ó simétrico, éster acti
 Fig.

17 Bis



269418



- Catálisis ó electrolisis (para R' = NO₂)
 ó Di-carbobenzoxi, R'' = OBz ó ONBz; R = T,
 (en este último caso disociación con hidracina);
 co, éster activado, azuro, amida activada.

Fig. 7



269418

- Los grupos libres funcionales, que no participan en la reacción, se protegeran convenientemente, especialmente mediante la hidrólisis o reducción de restos fácilmente dissociables, el grupo carboxílico
5. ventajosamente mediante esterización, por ejemplo con metanol, butanol terc., alcohol bencílico, alcohol p-nitrobencílico, el grupo amínico por ejemplo por introducción del resto tosílico, tritílico o del grupo carbobenzoxi o grupos protectores coloridos, tal como
10. el grupo p-fenilazo-benciloxi-carboxílico y el grupo p-(p'-metoxi-fenilazo)-benciloxi-carboxílico, ó especialmente el resto butilo terc.-oxicarboxílico. Para la protección del grupo amínico en la agrupación guanidílica de la arginina es adecuado el grupo nitro; el mencionado grupo amínico de la arginina, sin embargo, no
15. ha de ser necesariamente protegido durante la reacción.

- La transformación de un grupo SH ó NH₂ protegido en un grupo libre, así como la transformación de un grupo carboxílico funcionalmente modificado en un
20. grupo carboxílico libre en el transcurso del procedimiento para la obtención de los nonadecapepturos y productos intermedios, se efectua según métodos conocidos mediante tratamiento con medios hidrolizantes resp. reductores.

25. La invención se refiere también a aquellas formas de ejecución del procedimiento en las cuales se parte de un compuesto que se obtiene como producto intermedio en cualquier etapa del procedimiento y se efectuan las etapas del procedimiento que faltan o el procedimiento se interrumpe en cualquier etapa, así como los productos
- 30.



260418

- intermedios que aquí se obtienen. Según el modo de trabajo se obtienen los nuevos compuestos en forma de bases o de sus sales. De las sales se pueden obtener las bases en forma y a conocida. De estas últimas se pueden obtener
5. las sales mediante reacción con ácidos que sean adecuados para la formación de sales de aplicación terapéutica, tal como por ejemplo ácidos inorgánicos, tal como los ácidos halogenohidrogénicos, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido bromohidrogénico, ácido nítrico, ácido tiociánico,
 10. ácido sulfúrico, ácido fosfórico, o con ácidos orgánicos, tal como el ácido acético, ácido propionico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirogálico, ácido oxálico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinamónico, ácido salicílico, ácido 2-feoxi-ó 2-acetoxibenzoico, ácido amigdalico,
 15. ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido benzólico-o toluenosulfónico.

- Los nonadecapepturos obtenidos según el presente procedimiento se pueden emplear en forma de preparados farmacéuticos. Estos contendrán a los pepturos en mezcla
20. con un material vehículo orgánico, o inorgánico, farmacéutico, adecuado para la aplicación eteral 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, estearato
 25. de magnesio, talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma, glicoles, polialquilénicos, vaselina, colestestina u otros vehículos medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar por ejemplo, como
 30. tabletas, grageas, polvos, ungüentos, cremas, supositorios o en forma líquida como soluciones, suspensiones o



20.418

emulsiones. En caso dado estarán esterilizados y/o contendrán materias auxiliares, tales como agentes de conservación, estabilización reticulación y emulsión. Pero también pueden contener otros materiales terapéuticamente valiosos.

5.

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

10.

Para la cromatografía de papel se emplearon los siguientes sistemas:

Sistema 40: n-butanol - etanol - agua = 2:2:1

" 41: butanol terc. - n-butanol - agua = 4:3:3

" 42: n-propanol - éster acético - agua = 7:1:2

" 45: butanol sec. - 3 % amoníaco = 100 : 44

15.

" 48: n-butanol - acetona - amina dietílica -
agua = 10:10:2:5

" 49: butanol sec. - amina trietílica - ácido
dietilparbitúrico - agua - isopropanol =
= 100:0,8:1,8 g:60:10

20.

" 50: alcohol amílico terc. - isopropanol - amina
trietílica - veronal - agua =
= 100:40:0,8:1,8 g:50

" 52: n-butanol - ácido acético - agua = 100:10:30

" 54: butanol sec. - isopropanol - ácido monocloro-
acético - agua = 70:10: 3 g:40.

25.



269418

EJEMPLO 1

Ester etílico de la N^α-tritrilo-N^ε-butilo terc.-oxiocarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina.

- 963 mg de éster etílico de la N^ε-butilo terc.-oxiocarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina (obtenida según la patente belga 594 338 (Case 4351/1-3 - Ejemplo 13) se disuelven en 15 cm³ de cloruro metilénico abs., se agregan 561 mg de clorometano trifenílico puro y 0,31 cm³ de amina trietífica abs, y la solución se deja durante 18 horas a temperatura de ambiente. A continuación se lava la solución cloruro metilénica, enfriando con hielo, con solución de ácido cítrico diluido y agua, se seca con sulfato sódico y se evapora. El residuo (1,40 g) se disuelve en algo de éter y se precipita con mucho éter de petróleo, obteniéndose 1,28 g de éster etílico de la N^α-tritrilo-N^ε-butilo terc.-oxiocarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina como polvo; Punto de fusión aprox. 50-60°. El producto está lo suficientemente limpio para ulteriores reacciones.

20. EJEMPLO 2

N^α-tritrilo-N^ε-butilo terc.-oxiocarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina.

- 1,20 g de éster etílico de la N^α-tritrilo-N^ε-butilo terc.-oxiocarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina se disuelven en 30 cm³ de dioxano y se agregan 7 cm³ de agua. A continuación se enfría la solución a 2° y se agregan 2,0 cm³ de sosa caústica l-n. Se deja durante una hora a 2°, después durante otra hora a temperatura de ambiente y seguidamente se neutraliza mediante la adición de algo de dióxido de carbono sólido.



269418

- A continuación se evapora la solución hasta secar, la resina residual se mezcla con 30 cm³ de agua, se filtra de algo de material sin disolver y el filtrado se acidifica enfriando a 2^o con ácido cítrico a un pH de 2. De esta manera se separa el derivado tetrapeptúrico como precipitación fina gelatinosa. Esta se filtra en vacío, se lava neutro con mucha agua y se seca sobre ácido sulfúrico. Rendimiento :1,06 g. P.F. aprox.86-117^o. El producto se disuelve fácilmente en alcalis fuertemente diluidos, es de difícil solución en agua y de fácil solución en tetrahidrofurano, dioxano, formamida dimetílica y nitrilo acético.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 3

- a) Ester butílico terc. de la N^α-trilito-N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-(N^ε-butilo terc.-oxicarbonil)-L-lisilo-(N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo)-L-lisilo-nitro-L-arginilo-nitro-L-arginilo-L-prolina
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.
- 125 mg de éster butílico terc. de la N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-(N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo)-L-lisilo-nitro-L-arginilo-nitro-L-arginilo-L-prolina (obtenida según la patente belga nº 594 338 - Case 4351/1-3 - ejemplo 10) se disuelven en 0,5 cm³ de formamida dimetílica, se agregan 114 mg de N^α-trilito-N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina así como 2 cm³ de nitrilo acético, la solución se enfría a -15^o y se mezcla con 38 mg de carbodiimida dicitohexílica. Después de 30 minutos a -15^o y 2 días a 2^o se filtra en vacío del material precipitado y se lava con algo de acetonitrilo y metanol. Se obtienen 25 mg de



269418

- úrea díciclohexílica. El filtrado se evapora hasta secar y frotando se lava a fondo con éter de petróleo, solución de ácido acético diluida fría como el hielo, agua, solución de bicarbonato de sosa y agua. Después
5. de secar en vacío se disuelve para su ulterior limpieza en éster acético y se precipita con mucho éter y el material sin disolver se frota finalmente con poca acetona fría como el hielo. De esta manera se obtiene el derivado nonapeptúrico puro como polvo insoluble en acetona
10. del punto de fusión $153 - 170^{\circ}$ $[\alpha]_D^{26} = -14,3^{\circ} \pm 1,0^{\circ}$ ($c = 1,13$ en formamida dimetílica).
Análisis: $C_{85}H_{132}O_{20}N_{20}$, calculado N 15,97, encontrado 15,88 %
- El espectro ultravioleta (en alcohol fino)
15. muestra el máximo característico para el grupo de guanidina nitro en $270 \text{ m}\mu$; $\log \epsilon = 4,51$.
- Después de la hidrólisis de una prueba del derivado nonapeptúrico con ácido sulfúrico conc. (1 hora a 40°) se muestra la L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-
20. glicilo-L-lisilo-L-lisilo-nitro-L-arginilo-nitro-L-arginilo-L-prolina prácticamente unitaria en los cromatogramas de papel. $R_f(40) = 0,0$; $R_f(54) = 0,10$; trayecto de recorrido = 11,5 cm (después de 39 horas de paso en el sistema 45).
25. b) Ester butílico terc. de la N^{α} -(fenilazo-benciloxicarbonilo)- N^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-(N^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo)-L-lisilo-(N^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo)-L-lisilo-nitro-L-arginilo-nitro-L-arginilo-L-prolina
30. 1. Obtención según el método de los anhídridos mixtos:



- 949 mg de N^α-(fenilazo-benciloxicarbonilo)-N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valiloliglicina (obtenida según la patente belga nº 594 338 - Case 4351/1-3 - ejemplo 12) se disuelven en 10 cm³ de formamida dimetílica abs, y se agregan 0,20 cm³ de amina trietílica abs. A continuación se enfría a 0° y se agregan 0,12 cm³ de éster etílico del ácido clorofórmico. Después de 30 minutos a 0° se agregan una solución de 715 mg de éster butílico terc. de la N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-(N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo)-L-lisilo-nitro-L-arginilo-nitro-L-arginilo-L-prolina (obtenida según la patente belga nº 554 338 - Case 4351/1-3 - ejemplo 10) en 15 cm³ de formamida dimetílica abs. y la solución se deja durante 22 horas a temperatura de ambiente. Después se destila la formamida dimetílica en alto vacío a 40° de temperatura el baño y el residuo se lava enfriando con hielo y frotando a fondo, con agua, solución de ácido cítrico diluido, solución de bicarbonato de sosa diluido y agua. Después de secar sobre ácido sulfúrico se obtienen 1,49 g de polvo naranja, P.F. aprox. 110-145°. Para la ulterior limpieza se disuelve en acetona y se precipita con éter. La repetición de esta precipitación de 944 g de derivado nonapeptúrico protegido, puro, como polvo naranja del P.F. 135-160°.
2. Obtención según el método carbodimídico
- 740 mg del derivado tetrapeptúrico (Patente belga nº 594 338 - Case 4351/1-3 - ejemplo 12) y 800 mg del derivado pentapeptúrico (Patente belga nº 594 338 - Case 4351/1-3 - ejemplo 10) se disuelven en 10 cm³ de formamida dimetílica abs. y a la solución enfriada a -10°



263418

- se agregan 250 mg de carbodiimida diciclohexílica. Después de 30 minutos a -10° y 2 días a 2° se filtra en vacío de la úrea diciclohexílica precipitada, el filtrado se libera en alto vacío a 40° de la formamida dimetílica y el residuo de la evaporación se frota, para retirar la carbodiimida diciclohexílica en exceso, varias veces con éter de petróleo. El polvo insoluble en el éter de petróleo se lava como descrito bajo 1) y se precipita de acetona-éter. Se obtienen 720 mg de derivado nonapeptúrico. P.F. aprox. $130-160^{\circ}$; el producto contiene aún poca úrea diciclohexílica. Para su eliminación se disuelve el polvo naranja, con el menor metanol posible, por calentamiento y la solución se deja a 0° , separándose así en forma cristalina la úrea diciclohexílica. Después de filtra en vacío se obtiene el derivado nonapeptúrico del filtrado mediante precipitación con éter.
5. c) Ester butílico terc. de la N^{α} -carbobo-
xi- N^{ϵ} -
butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-pro-
lilo-L-valilo-
20. glicilo-(N^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo-)-L-
lisilo-(N^{ϵ} -
-butilo terc.-oxicarbonilo-)-L-lisilo-nitro-
L-arginilo-
nitro-L-arginilo-L-prolina

- En forma análoga a como descrito bajo b) se puede obtener el éster butílico terc. de la N^{α} -carbobo-
25. xi- N^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-pro-
lilo-L-valilo-glicilo-(N^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo-)-L-
lisilo-(N^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo-)-L-lisilo-nitro-
L-arginilo-nitro-L-arginilo-L-prolina por condensación
de éster butílico terc. de la N^{ϵ} -butilo terc.-oxi-
30. carbonilo-L-lisilo-(N^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo-)



269418

-L-lisilo-nitro-L-arginilo-nitro-L-arginilo-L-prolina con N^α-carbobozenoxi-N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina. Este compuesto se obtiene como sigue=

5. a) Ester etílico de la N^α-carbobozenoxi-N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina

- 44,4 g de éster etílico de la L-prolilo-L-valilo-glicina (obtenida según la patente belga nº 594 338 - Case 4351/1-3 - ejemplo 11) y 62,0 g de N^α-carbobozenoxi-N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisina (obtenida según Case 4351, ejemplo 2) se disuelven en un litro de acetonitrilo y la solución se enfría a -10°, solidificando así todo en forma gelatinosa. (Se forma la sal de los dos componentes). A pesar de esto se agregan 36,7 g de carbodiimida dicitclohexílica, disueltos en poco acetonitrilo, y se agita fuertemente. Lentamente se disuelve la sal gelatinosa y empieza la separación de la úrea dicitclohexílica. Después de 15 horas a 2° ha vuelto a solidificar todo (Mezcla de úrea dicitclohexílica cristalina y derivado tetrapeptúrico gelatinoso). Este último se disuelve mediante la adición de mucha acetona, a continuación se filtra en vacío la úrea dicitclohexílica sin disolver (37,5 g P.F. 222 - 225°). El filtrado se concentra por evaporación, el residuo se recibe en mucho éster acético, se lava enfriando con hielo con solución de ácido cítrico diluido, solución de bicarbonato sódico y solución de sulfato sódico. Después de secar con sulfato sódico y evaporar se cristaliza el residuo de poca acetona. Se obtienen 85 g de derivado tetrapeptúrico del P.F. 132-135°. Para el análisis se vuelve a recrystalizar
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



269418

varias veces de acetona; el producto de análisis puro tiene el punto de fusión 133-135° $[\alpha]_D = -78^\circ$ (en alcohol fino).

5. La N^ε-BOC-L-lisina se puede obtener en lugar de como en el procedimiento de la patente belga nº 594 338 (Case 4351/1-3) en la forma siguiente:

10. 2,05 g de L-lisina (obtenida del monohidrocloreuro con amberlite IRA 410) 1,33 g de carbonato t-butilo-fenílico, 10 cm³ de agua y 10 cm³ de metanol se agitan durante 16 horas a 60°. La solución se acidifica a 0° ligeramente con ácido acético 2-n, se extrae tres veces con éter y la solución acuosa se agita entonces con unos 100 cm³ de amberlita XE-64 durante 30 minutos a 0°.
15. El intercambiador de iones se filtra, el filtrado se filtra a través de una pequeña columna del mismo intercambiador de iones y a continuación se concentra por evaporación en vacío a 40° hasta la cristalización. Después de reposar a 0° se filtra en vacío la N^ε-BOC-lisina cristalizada en forma gelatinosa, se lava una vez con poca agua fría como el hielo y se seca en vacío a temperatura de ambiente.
20. Rendimiento= 1360 mg = 80 % calculado sobre el carbonato t-butilo-fenílico o 40 % calculado sobre la lisina.

25. El producto es unitario en el cromatograma de papel. La lisina en exceso se puede recuperar del intercambiador de iones.

30. La N^ε-BOC-lisina se puede obtener también con carbonato t-butilo-p-nitrofenílico en un rendimiento del 76 % calculado sobre la lisina.



269418

El producto se puede carbobenzoxilizar en forma conocida, por ejemplo mediante reacción con cloruro carbobenzoxi y sosa caústica según el procedimiento descrito en la patente belga nº 594 338 (Case 4351/1-3 ejemplo2).

5.

b) N^α-carbobenciloxi-N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina

10.

660 mg del derivado tetrapeptúrico obtenido arriba en a) se disuelven en 20 cm³ de alcohol fino, se agregan 3 cm³ de agua, se enfría a 2º y se mezcla con 1,1 cm³ de sosa caústica l-n. Después de 2 horas a 2º se agregan 50 cm³ de agua, el pH de la solución se pone mediante adición de dióxido de carbono sólido a unos 8 y el alcohol se destila en vacío. La solución acuosa

15.

residual se filtra de algo de material sin disolver, se enfría a 2º y con ácido cítrico se acidifica a un pH de 2. De esta manera se separa el ácido tetrapeptúrico como precipitación de copos finos. Se filtra en vacío, se

20.

lava varias veces con agua de hielo y se seca sobre ácido sulfúrico. Se obtienen 600 mg de N^α-carbobenciloxi-N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicina en forma de un polvo blanco del punto de fusión aprox. 80 - 100º. El producto se puede seguir reaccionando sin ulterior limpieza.

25.

EJEMPLO 4

Ester butílico terc. de la N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-(N^ε-butilo terc. - oxicarbonilo)-L-lisilo-(N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo)-L-lisilo-nitro-L-arginilo-nitro-L-arginilo-L-prolina

30.

El derivado tritilo-nona-peptúrico obtenido en



269418

el ejemplo 3 de destritiliza selectivamente en la forma siguiente:

- 20 mg del producto insoluble en acetona se disuelven en 0,5 cm³ de ácido acético acuoso al 75 % .
5. Después de 30 minutos a 30° se evapora hasta secar y el residuo se frota varias veces contra éter para eliminar el carbinol trifénílico. El residuo insoluble en éter se disuelve en algo de n-butanol saturado con agua para eliminar el ácido acético. La solución butanólica se
10. lava enfriando con hielo con poca solución de potasio saturada y solución de sulfato sódico diluida, se seca con sulfato sódico y se evapora. Se obtienen 15 mg de nieve incolora. En la cromatografía de papel Rf (42) = 0,86; Rf (41) = 0,87; Rf (40) = 0,91.

15.

EJEMPLO 5

Ester butílico terc. de la N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-(N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo)-L-lisilo-(N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo)-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina

20.

1.a) Acetato

- 19 mg del derivado nonapeptúrico obtenido según el ejemplo 4 se disuelven en 3 cm³ de metanol, se agregan 0,1 cm³ de ácido acético acuoso 1-n y en presencia de 20 mg de carbón de palladio (10 % Pd) se hidriza.
25. Después de 4 horas ha terminado la hidrización. Se filtra en vacío del catalizador, se lava ulteriormente con algo de ácido acético diluido y se evapora. El residuo contiene aún algo de acetato amónico (amoníaco formado por la reducción de la grupos nitro de guanidina);
30. para su eliminación se disuelve varias veces en poca



207418

- agua y la solución se liofiliza, con lo que sublima lentamente el acetato amónico. Esta operación se repite tantas veces hasta que no se demuestra más sal amónica en el residuo. El producto se transforma como descrito más abajo en el tri-tisolato. (Rf (45) = 0,91; Rf (48) = 0,80.
- 5.

b) Tri-tisolato

- El residuo libre de amonio, contenido en a) se disuelve en agua y enfriando a 2° se mezcla con la cantidad exactamente calculada (3 equivalentes) de solución acuosa al 0,1-n de ácido p-toluenosulfónico con lo que se precipita una parte del tri-tisolato del nonapepturo en forma de grasa. Sin embargo, la mezcla se congela inmediatamente a -80° y se seca por congelación.
- 10.
- 15.
- El residuo casi incoloro (pólvo) se frota con mucho éter. Este producto está lo suficientemente limpio para ulteriores reacciones.

- 2) 875 mg del derivado nonapeptúrico obtenido en el ejemplo 3b se disuelven en 40 cm³ de metanol, se agregan 5 cm³ de ácido acético 1-n y la solución se hidriza en presencia de carbón de palladio (10 % Pd). El dióxido de carbono, que se forma durante la hidrización, se recoge mediante un segundo aparato de hidrización llenado con sosa caústica. Terminada la hidrización se aspira del catalizador, éste se lava con mucho metanol y 1 % de ácido acético y el filtrado se evapora en vacío hasta secar. Para retirar la anilina y toluidinà, formada durante la hidrización, se reparte entre éter y agua y la fase acuosa se lava 3 veces con éter. La fase acuosa se pone, para eliminar el
- 20.
- 25.
- 30.



269418

- amoniaco formado durante la hidrización, con amina trietífica a un pH de 10, después se evapora inmediatamente y se seca en alto vacío. Una prueba del residuo no muestra en el espectro ultravioleta absorción en
5. 270 m μ , tal y como es característico para el resto nitro de la guanidina. El residuo de evaporación se disuelve a continuación en 10 cm³ de agua y enfriando con hielo se mezcla en porciones con un total de 4,5 cm³ de solución acuosa de ácido p-toluenosulfónico 0,5-n
10. (pH aprox. 2,5), después se congela inmediatamente y se liofiliza. El residuo del secado se frota varias veces con éter para eliminar el ácido p-toluenosulfónico y el p-toluenosulfonato trietilamínico en exceso. Se obtienen 644 mg de tri-p-toluenosulfonato del derivado
15. nonapeptúrico. Según el comportamiento en el cromatograma de papel el producto es idéntico al material descrito bajo 1).

- 3) En forma análoga se pueden obtener el acetato y el tri-tisolato del derivado nonapeptúrico de
20. arriba, también mediante hidrización catalítica del éster butílico terc. de la N ^{α} -carbобензоxi-N ^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-(N ^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo-)-L-lisilo-(N ^{ϵ} -butilo terc.-oxicarbonilo-)-L-lisilo-nitro-L-arginilo-nitro-L-
25. arginilo-L-prolina que se obtiene según el ejemplo 3 c).

EJEMPLO 6

- Sulfonato ditoluénico del acetato del éster butílico
terc. de la butilo terc.-oxicarbonilo-L-serilo-L-
tirosilo-L-serilo-L-metionilo-L-glutaminilo-L-histidilo-
30. L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo- ϵ -



269418

butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-
glicilo- ϵ -butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo- ϵ -butilo
terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina

- 400 mg de sulfonato tri-toluénico del éster butílico terc. de la ϵ -BOC-lisilo-prolilo-valilo-glicilo - ϵ -BOC-lisilo- ϵ -BOC-lisilo-arginilo-arginilo-prolina se disuelven en 5 cm³ de formamida dimetílica recién destilada bajo ligero calentamiento, se enfría a 0° y se mezcla con 0,3 cm³ de una solución de amina trietílica en formamida dimetílica (0,22 mMol). Después de agitar durante 40 minutos a 0° se agregan 440 mg (0,3 mMol) de BOC-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu(NH₂)-His-Phe-Arg-Try-Gly-OH= acetato (solicitud de patente belga n° 481 450 - Case 4556/1+2 ejemplo 5) disuelto en 10 cm³ de formamida dimetílica y después de agitar durante otros 10 minutos se mezcla la mezcla de reacción con 125 mg (0,6 mMol) de carbodiimida N,N'-diciclohexílica. Se deja reaccionar durante 2 días a 0° y un día a temperatura de ambiente, se filtra de la úrea diciclohexílica precipitada y el producto de reacción en bruto se precipita con mucho éster acético. La precipitación se filtra a través de una frita de cristal. Después de secar en alto vacío sobre pentóxido de fósforo se obtienen 700 mg de ditoluenosulfonato de acetato del éster nonadecapeptúrico butiloxicarbónilico en bruto.
5. El cromatograma de papel en el sistema 45 y 54 muestra, además de pocos pepturos iniciales, una mancha nueva distinta a la del BOC-decapepturo y éster nonapeptúrico que da reacción positiva seg. Pauly y Sakagiuchi y negativa ninhidrílica.
10. El éster butílico terc. del nonadecapepturo
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



269418

protegido se puede emplear directamente sin ulterior limpieza.

EJEMPLO 7

5. Hexaacetato de L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-metionilo-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicina-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-L-lisilo-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina

10. 700 mg de éster butílico terc. nonadecapeptúrico-BOC se dejan reposar durante 1 hora a temperatura de ambiente con 7 cm³ de ácido trifluoroacético anhidro. El ácido trifluoroacético se evapora en vacío a 40°, se rasca el residuo en forma de melaza repetidas veces con mucho éter abs. El trifluoroacetato de nonadecapepturo se obtiene aquí en forma de polvo ligeramente rosa.

15. El compuesto secado en alto vacío se disuelve en 2 cm³ de agua y se lava con otros 60 cm³ de agua a través de una columna intercambiadora de iones Amberlita IR-4B/forma de acetato.

20. La solución acuosa se liofiliza. Se obtienen 300 mg de hexaacetato nonadecapeptúrico en bruto como compuesto hidrocópico.

25. La hidrólisis total muestra todos los ácidos amínicos deseados. En el texto según Sayer muestra el nonadecapepturo actividad ACTH.

EJEMPLO 8

a) Ester γ -t-butílico del éster α -bencilico del ácido carbobenzoxi-L-glutamínico

30. 8,3 g de éster α -bencilico del ácido carbobenzoxi-L-glutamínico (H. Sechs y E. Brand, J. Amer.



203418

- Chem.Soc. 75, 4610 /1953/) se enfrían en una botella de presión junto con 25 cm³ de dioxano abs. a -10°. Se agregan 95 cm³ de isobutileno licuificado y 0,42 cm³ de ácido sulfúrico conc., se cierra y se agita a 20° durante 20 horas. La mezcla que al principio es bifásica se hace homogénea después de unas 2 horas. Para la elaboración se mezcla con 100 cm³ de agua, se evapora el isobutileno y se extrae dos veces, cada una con 70 cm³ de éter. De las porciones etéricas reunidas se elimina el material inicial aún invariado mediante cuatro veces extracción cada una con 50 cm³ de solución de bicarbonato sódico saturado a 0°, y la fase orgánica se concentra por evaporación hasta secar después de lavar neutro y secar sobre sulfato de magnesio. Se obtiene un aceite incoloro que cristaliza después de algún tiempo y que después de secar en alto vacío funde a 40 - 44°. Rendimiento 6,02 g = 63 % de la teoría. El compuesto se puede recrystalizar de éster acético/éter de petróleo y funde entonces a 46-48°. De la solución acuosa de bicarbonato sódico se obtiene después de acidificar y extracción con éter 3,2 g de material inicial sin modificar.

b) Estere α -etilo- γ -butílico terc. del ácido carbobenziloxi-L-glutamínico

25. La solución de 3,5 g (11 mmol) de éster α -etilico del ácido carbobenzoxi-glutamínico (F. Weygand + K.Hunger, Z.Natf. 136, 50 /1958/) en 15 cm³ de dioxano abs. conteniendo 0,25 cm³ de ácido sulfúrico conc. se enfría en hielo seco/acetona y bajo exclusión de humedad se condensan en el recipiente de reacción
- 30.



203418

85 cm³ de isobutileno secado sobre sodio. La mezcla de reacción se agita 2 días a temperatura de ambiente. La solución clara se mezcla con 10 cm³ de solución de bicarbonato sódico l-n y el isobutileno y el dioxano se evaporan en vacío a temperatura de ambiente.

5. El residuo de evaporación se recibe en éter y se lava alternativamente con solución de bicarbonato l-n y agua hasta que una prueba acidificada de la solución de extracción alcalina no muestre ningún enturbiamiento. Los extractos étericos lavados neutro con agua se secan sobre sulfato sódico y en vacío se evaporan a 40° hasta secar. Se obtienen 3,6 g (90 % de la teoría) de éster α -etilo- γ -butílico terc. del ácido carbobenzoico-glutamínico aceitoso.

10. El diéster mixto en bruto se sigue reaccionando sin ulterior limpieza.

EJEMPLO 9

Ester γ -t-butílico del ácido carbobenzoico-L-glutamínico

a) 5,5 g de éster γ -t-butílico de éster α -bencílico del ácido carbobenzoico-L-glutamínico se disuelven en 25 cm³ de etanol y 5 cm³ de agua. Se agregan entonces 15,2 cm³ de sosa caústica l-n y se agita a 20°. El aceite precipitado inicialmente se disuelve en el transcurso de 5 minutos. Después de un total de 10 minutos se agregan 17 cm³ de ácido clorhídrico l-n se mezcla con 50 cm³ de agua y se extrae dos veces, cada una con 80 cm³ de éter. Las fases orgánicas se lavan neutro, se secan con sulfato de magnesio y se evaporan. Después de secar a 50° en alto vacío se obtienen 4,14 g de un aceite incoloro, viscoso (95 % de la teoría) que



se sigue empleando directamente para la elaboración
(El grupo éster t-butílico solo se saponifica en huellas
en el tratamiento con sosa caústica de arriba). El
compuesto da en el sistema 45 una mancha unitaria

5. $R_f = 0,85$.

b) 2,7 g (7,4 mmol) de éster α -etilo- δ -butílico terc.
del ácido carbobenzoxi-glutamínico se saponifican en
20 cm³ de dioxano al 90 % y 8,1 cm³ de sosa caústica
1-n durante 10 minutos a temperatura de ambiente, des-

10. pués se neutraliza con 8,1 cm³ de ácido clorhídrico 1-n
y el disolvente se evapora en vacío a 40°. El residuo
de evaporación se recibe en éter, se lava otra vez con
10 cm³ de ácido clorhídrico 0,1-n y finalmente neutro
con agua de la red. Después de secar sobre sulfato só-
15. dico y evaporar el éter se obtienen 2,3 g de producto
de saponificación aceitoso en bruto.

Sal dicitclohexilamínica

Para la separación de las partes neutras se
reciben los 2,3 g del producto de saponificación en
20. 100 cm³ de éter y se agregan 2 cm³ de amina dicitclo-
hexílica. La sal dicitclohexilamínica del éster δ -butí-
lico terc, del ácido carbobenzoxi-glutamínico se separa
pronto como agujas finas blancas. Después de reposar
durante 4 horas se filtran los cristales, se lava bien
25. con éter y la sal se seca en vacío.

El rendimiento asciende a 3,0 g (83 % de la
teoría); P.F. = (129) 138-139°.

La sal dicitclohexilamínica del éster δ -butí-
lico terc. del ácido carbobenzoxi-glutamínico se puede
30. recrystalizar de mucha agua caliente o metanol al



269418

50 % P.F. = 139 - 140°.

El compuesto en bruto y cristalizado en unitario en el cromatograma de papel. El valor Rf en el sistema 45 es 0,85.

5. (El cromatograma secado se rocía con una solución al 0,005 % de acridina en etanol y a continuación se determinan las manchas en la luz ultravioleta).

Díscociación de la sal dicitohexilamínica

10. 3,0 g de sal se disuelven en 60 cm³ de etanol al 50 % se agregan 5 cm³ de Dowex 50 X-8 y todo ello se agita durante 30 minutos a temperatura de ambiente. La solución liberada del intercambiador de iones se evapora en el vacío al chorro de agua a 40° hasta un pequeño volumen, el residuo se recibe en éter y la solución se seca sobre sulfato sódico. Después de evaporar se obtienen 1,95 g (100 %) de éster δ -butílico terc. del ácido carbobenzoxi-glutamínico cromatográficamente puro en forma de aceite.

15. c) 2 g de ácido carbobenzoxi-L-glutamínico se disuelven en una botella de presión en 6 cm³ de dioxano, se enfría a -10° y se cubre con 25 cm³ de isobutileno licuificado y 0,1 cm³ de ácido sulfúrico conc. Se agita durante 5 horas a 20° con lo que la mezcla, al principio bifásica, se homogeniza después de unas 2-3 horas. Después de agregar 30 cm³ de agua se evapora a aprox. 2/3 del isobutileno, se mezcla con 50 cm³ de éster acético y la fase orgánica se lava con agua. Después de secar sobre sulfato de magnesio, evaporar y breve calentamiento del residuo incoloro, aceitoso en alto vacío a 50° se obtienen 2,46 g de producto en bruto que se compone de ácido carbobenzoxi-L-glutamínico, éster δ -t-butílico del ácido
- 20.
- 25.
- 30.



269418

- carbobenzoxi-L-glutamínico, éster δ -t-butílico del ácido carbobenzoxi-L-glutamínico y éster α, δ -di-t-butílico del ácido carbobenzoxi-L-glutamínico. Los rendimientos, referidos al ácido carbobenzoxi-L-glutamínico empleado, ascienden a 15, 25, 35 y 25 %, según el orden de arriba. De esta mezcla se retira primeramente por cristalización de cloruro metilénico-éter de petróleo 1:1 la mayor parte del ácido carbobenzoxi-L-glutamínico de difícil solución. Del filtrado evaporado hasta secar se precipita, después de disolver en éter y mezclar con algo más de la cantidad calculada de amina dicitclohexílica, primeramente el derivado de difícil solución del éster δ -t-butílico del ácido carbobenzoxi-L-glutamínico junto con un poco de sal bis-dicitclohexilamínica del ácido carbobenzoxi-L-glutamínica. De la lejía madre se obtiene mediante recristalización repetida de metanol-éter y etanol-agua la sal dicitclohexilamínica del éster δ -t-butílico del ácido carbobenzoxi-L-glutamínico. P.F. 138-140°.

20.

EJEMPLO 10

Ester metílico de la carbobenzoxi-(δ -t-butilo-)-L-glutamilo-L-histidina

- 719 mg de éster δ -t-butílico del ácido carbobenzoxi-L-glutamínico y 432 mg de éster metílico de L-histidina del P.F. 58-61° se disuelven juntos en 6 cm³ de acetonitrilo y después de enfriar a 0° se agregan 527 mg de dicitclohexil-carbodiimida en forma sólida. Después se agita durante 4 horas a 0° y después durante 12 horas aún a 25°. Finalmente se filtra la úrea dicitclohexílica separada, se enjuaga con poco éster



269418

- acético y del filtrado se precipita mediante adición de 60 cm³ de éter de petróleo el dipepturo en forma de gelatina. Se filtra, se lava con éter de petróleo y el producto en bruto se seca. Mediante precipitación de éster acético-éter se obtienen 892 g (86 % de la teoría) de producto puro como polvo microcristalino blanco del P.F. 116°. Rf (49) = 0,96; Rf (54) = 0,95. Después de disociar el grupo del éster t-butílico (5 minutos con ácido trifluoroacético a 20° reposando) es el Rf (49) = 0,69; Rf (54) = 0,78.
- 5.
- 10.

EJEMPLO 11

Carbobenzoxi-(δ -t-butilo)-L-glutamilo-L-histidina

- 488 mg de éster metílico de la carbobenzoxi-(δ -t-butilo)-L-glutamilo-L-histidina se disuelven en 1,5 cm³ de metanol y mediante reposo con 1,2 cm³ de sosa caústica 1-n durante 8 minutos se saponifica a 20°. Después de agregar 1,2 cm³ de ácido clorhídrico 1-n se evapora en vacío hasta la mitad. Se extrae el pepturo con 20 cm³ de n-butanol y entonces la fase butanólica se lava varias veces cada una con aprox. 3 cm³ de agua hasta que la prueba de cloruro sea negativa. Se evapora el metanol hasta un pequeño resto y del residuo aceitoso se precipita mediante adición de éster acético y éter de petróleo el pepturo como masa gelatinosa. Después de filtrar, lavar con éter de petróleo y secar se vuelve a precipitar el producto en bruto obtenido de metanol-éster acético-éter de petróleo. Se obtienen así 402 mg de producto puro (85 % de la teoría) que funde inexactamente a unos 120°. El compuesto muestra ser unitario en la cromatografía de papel. Rf (49) = 0,84;
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



269418

Rf (54) = 0,90. Después de la disociación del grupo ester butílico terc. con ácido trifluoroacético (5 minutos a 20°) es el Rf (49) = 0,44; Rf (54) = 0,77.

EJEMPLO 12

5. Hidracida de carbobenzoxi-(γ -t-butilo-)L-glutamilo-L-histidina
- 2,44 g (5 mMol) de éster metílico de carbobenzoxi-(γ -t-butilo-)L-glutamilo-L-histidina, disueltos en 20 cm³ de etanol abs., se enfrían a 0° y se mezcla con 0,8 cm³ de hidrato hidracínico. Después de reposar durante 60 horas a esta temperatura se evapora el alcohol a un pequeño volumen y el residuo se mezcla con mucho éter. El hidracida carbobenzoxi-dipeptúrico se precipita como producto viscoso que solidifica después de reposar largo tiempo a 0° y frecuentemente rascado. La cantidad principal del hidracida se precipita como producto gelatinoso. Se deja reposar 10 horas a 0° la precipitación gelatinosa se filtra a través de una frita de cristal G.2, se lava con mucho éter y éter de petróleo y finalmente se seca a 40° en alto vacío. Rendimiento 2,3 g (94 % de la teoría) P.F. 119-120°.

15. El hidracida se disuelve bien en etanol frío y metanol, por el contrario muy difícil en éster acético también bajo calor. Recristalizado repetidas veces de metanol/agua funde el preparado de análisis a 140-142° (sinteriza a 75°) $[\alpha]_D^{26} = -37,8^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ (c = 2,333 en ácido clorhídrico 1-n).
- 20.
- 25.



209418

EJEMPLO 13

Ester metílico de la L-fenilalanil-nitro-L-arginilo-L-triptofilo-glicina

- 3,5 g (4,6 mMol) de éster carbobenzoxi-tetra-
5. peptúrico (patente belga 580297 Case 4074/1 + 2 - ejemplo 27) se disuelven calentando ligeramente en 8 cm³ de ácido acético glacial y la solución enfriada nuevamente a temperatura de ambiente se mezcla con 8 cm³ de solución de ácido bromohidrogénico-ácido acético
10. glacial 4-n. Después de reposar durante 60 minutos se evapora la cantidad principal de ácido acético glacial y el ácido bromohidrogénico en exceso en vacío y el residuo gelatinoso se rasca con mucho éter abs. El dihidrobromuro teñido ligeramente rojo se precipita
15. una vez de poco metanol abs. con mucho éter, se seca en vacío y a continuación se reparte entre 5 cm³ de solución de sosa 2-n y 40 cm³ de cloroformo:butanol (1:1). Las fases orgánicas se tratan con solución de sosa hasta la reacción fenolftalein-alcalina y los extractos alcalinos acuosos se extraen aún 2 veces con cloroformo:
20. butanol; La solución cloroformo:butanólica secada sobre sulfato sódico se evapora en vacío hasta un pequeño volumen y el éster tetrapeptúrico se precipita con mucho éter de petróleo. Rendimiento: 2,4 g (84 % de
25. la teoría).

En el cromatograma de papel, en los sistemas 52 y 54 muestra este solo una mancha Pauly y Ehrlich-positiva con los valores R_f 0,55 resp. 0,75.

EJEMPLO 14

30. Ester metílico de la carbobenzoxi-(δ -t-butilo)L-



269418

glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-nitro-L-arginilo-L-triptofilo-glicina

a) de dicitclohexilcarbodiimida

- 474 mg (1 mMol) de carbobenzoxi-(γ -t-butilo-) L-glutamilo-L-histidina y 623 mg (1 mMol) de éster metílico de L-fenilalanilo-nitro-L-arginilo-L-triptofilo-glicina se disuelven bajo calentamiento en 2,5 cm³ de formamida dimetílica abs. y 15 cm³ de acetonitrilo abs. Después de enfriar a 0° se agregan 248 mg (1,2 mMol) de
10. dicitclohexilcarbodiimida en forma sólida y se agita durante 6 horas a 0° y a continuación durante 18 horas a 22°. Finalmente se precipita de la solución de reacción mediante adición de mucho éter seco el producto en bruto, junto con un poco de úrea dicitclohexílica.
15. (Total 1020 mg P.F. aprox. 140°). Se disuelven bajo calentamiento en 20 cm³ de metanol y el derivado hexapeptúrico se precipita después de enfriar mediante adición de 120 cm³ de éter seco en forma de precipitación coposa. Después de disolver y precipitar 2 - 3 veces en
20. forma análoga y elaboración de las lejías madre se obtienen en total 780 mg (= 72 % de la teoría) de un polvo amorfo ligeramente marrón del P.F. aprox. 155-165°. El cromatografía de papel muestra el compuesto después de la disociación del grupo éster t-butílico con ácido trifluoroacético (10 min. a 20°) el R_f (49) = 0,84, después de saponificación adicional del grupo
25. éster metílico con sosa caustica 1-n en metanol-agua (5 minutos a 22°) el R_f (49) = 0,62.

b) mediante azuro

30. 540 mg (1,1 mMol) de hidracida de carbobenzoxi-



269418

- (γ -t-butilo-)L-glutamilo-L-histidina se disuelven en 4 cm³ de ácido clorhídrico 1-n, se enfría a 0° y se mezcla con 1,2 cm³ de solución de nitrito sódico 1-n fría como el hielo. Después de 3 minutos se pone la
5. solución de reacción fenolftaleinalcalina con solución de sosa 2-n (2,7 cm³) fría como el hielo y el azuro precipitado se extrae 2 veces con 15 cm³ de éster acético frío como el hielo. Los extractos éster acéticos se lavan neutro con agua (2 veces 5 cm³), a 0° se seca
10. sobre sulfato de magnesio y el alto vacío a temperatura de ambiente se evapora hasta un pequeño volumen.

- La solución de azuro se reúne con la solución fría como el hielo de 475 mg (0,75 mMol) de éster metílico de la L-fenilalanilo-nitro-L-arginilo-L-triptofilo-
15. glicina en 5 cm³ de formamida dimetflica y se deja reaccionar durante 60 horas a 0°. El disolvente se evapora en alto vacío a 40° hasta un pequeño volumen y el producto de reacción se precipita con mucho éster acético. La precipitación gelatinosa se centrifuga, se lava con
20. mucho éster acético, éter y éter de petróleo y en alto vacío se seca a temperatura de ambiente.

- El producto en bruto (720 mg) se disuelve y precipita de etanol al 95 % con éter, Rendimiento 600 mg (74 % de la teoría). P.F. = 165 - 170°. El preparado descrito bajo a) es idéntico al compuesto de
25. arriba.

EJEMPLO 15

Carbobenzoxi-(γ -t-butilo-)L-glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-nitro-L-arginilo-L-triptofilo-glicina

30. 450 mg (0,4 mMol) de éster metflico de la



269418

- carbobenzoxi-(γ -t-butilo-)L-glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-nitro-L-arginilo-L-triptofilo-glicina se saponifican en 7,5 cm³ de dioxano al 75 % con 0,5 cm³ de sosa caústica l-n durante 4 minutos a temperatura de ambiente. A continuación se neutraliza con 0,5 cm³ de ácido clorhídrico l-n y el dioxano se evapora a 40° bajo presión reducida. La solución lechosa se diluye con 25 cm³ de agua con lo que se separa el producto de saponificación como precipitación fina. Se deja reposar aún durante 60 minutos a 0°, se filtra y la precipitación se lava con agua. Después de secar en vacío sobre pentóxido de fósforo se obtienen 435 mg de carbobenzoxi-hexapepturo en bruto del punto de fusión 203 - 206° (descomp.) El carbobenzoxi-hexapepturo se puede recrystalizar en mucho metanol.

En el cromatograma de papel en los sistemas 45, 50 y 52 se traslada con el frente del disolvente.

EJEMPLO 16

- γ -t-butilo-L-glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicina

- 975 mg (0,9 mMol) de carbobenzoxi-(γ -t-butilo)-L-glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-nitro-L-arginilo-L-triptofilo-glicina se agitan en 100 cm³ de ácido acético al 90 % en presencia de 400 mg de catalizador 10 % Pd/carbón durante 17 horas a presión normal y temperatura de ambiente en una atmósfera de hidrógeno. La solución liberada del catalizador se evapora en vacío a 40° hasta secar y el residuo de evaporación se recrystaliza una vez de metanol/éter. Después de secar en alto vacío se obtienen 845 mg de éster γ -butilo terc., del hexapepturo.



En el espectro ultravioleta muestra

max 290 m μ ϵ = 4800

" 280 m μ ϵ = 5800

" 274 m μ ϵ = 5700

5. En la electroforésis de alta tensión se traslada el derivado peptúrico a 3000 Voltios y pH 1,9 durante 1 hora 14,5 cm y con la reacción según Pauly, Ehrlich y Sakaguchi, así como con ninhidrina de una reacción positiva.

10. EJEMPLO 17

Ester t-butílico de la carbobenzoxi-(γ -t-butilo)L-glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-nitro-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-(N ϵ -t-butiloxicarbonilo)-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-(N ϵ -t-butiloxicarbonilo)-L-lisilo-(N ϵ -butilo terc.-oxicarbonilo)-L-lisilo-nitro-L-arginilo-nitro-L-arginilo-L-prolina

15. 350 mg del derivado nonapeptúrico descrito en el ejemplo 4 así como 320 mg del derivado hexapeptúrico descrito en el ejemplo 15 se disuelven en 3 cm³ de formamida dimetílica y se agregan 9 cm³ de acetonitrilo así como 100 mg de carbodiimida dicitclohexílica. Después de 3 días a temperatura de ambiente se filtra en vacío la úrea dicitclohexílica precipitada, se lava con poca mezcla de formamida dimetílica-acetonitrilo y el filtrado se evapora hasta secar. El residuo se frota con mucho éter, éster acético y solución ácido acética al 1 % fría como el hielo y las partes insolubles se precipitan de la solución dimetilformamídica con una solución de amina trietílica al 1 % en éster acético. Esta precipitación (separación del derivado hexapeptúrico) se repite tres veces y las partes
- 20.
- 25.
- 30.



27-1-13

- insolubles el derivado (pentadecapeptúrico) se frota finalmente con poco metanol frío. El pentadecapepturo se obtiene así en forma de granulado gelatinoso de difícil solución en metanol del punto de fusión 192-197°. Después de retirar los grupos BOC y éster t-butílico con ácido trifluoroacético (1 hora a temperatura de ambiente) es el valor Rf (52) = 0,0; Rf (54) = 0,4-0,5
- 5.

EJEMPLO 18

10. Ester t-butílico de la (γ -t-butilo)-L-glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo (N ϵ -t-butiloxycarbonilo)-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-(N ϵ -t-butiloxycarbonilo)-L-lisilo-(N ϵ -t-butiloxycarbonilo)-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina

15. El pentadecapepturo obtenido en el ejemplo 17 se disuelve en ácido acético al 90 % y en presencia de carbón palladio (10 % Pd) se agita con una presión de hidrógeno de 5 atmósferas durante 5 horas. A continuación se agrega catalizador de carbón de palladio fresco y a 1 atm. de presión de hidrógeno se agita durante 12 horas. Se filtra en vacío del catalizador y el filtrado se evapora hasta secar. Para retirar las sales amónicas formadas durante la hidrización se disuelve el residuo en solución acuosa al 1 % de amina trietilica e inmediatamente se liofiliza. Este tratamiento se repite tantas veces hasta que en la sal amónica no se pueden demostrar más sales amónicas.
- 20.
- 25.

30. El derivado pentadecapeptúrico obtenido muestra en la electroforésis de papel (pH = 1,9; 45 V/cm; 1 hora) un trayecto de recorrido de aprox. 12,5 - 14,2 cm.



Reacción positiva con ninhidrina y según Pauly, Sakaguchi y Folin.

EJEMPLO 19

5. Ester t-butílico de la t-butiloxycarbonilo-L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-metionilo-(γ -t-butilo)-L-glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-(N ϵ -t-butiloxycarbonilo)-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-(N ϵ -t-butiloxycarbonilo)-L-lisilo-(N ϵ -t-butiloxycarbonilo)-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina

10. 60 mg del derivado pentadecapeptúrico obtenido en el ejemplo 18 se disuelven en 1 cm³ de formamida dimetífica y 0,2 cm³ de agua. A continuación se mezcla a 2^a con 0,01 cm³ de amina trietífica y 30 mg de azuro BOC-L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-metionínico (obtenido según la solicitud belga 481 450 - Case 4556/1+2, ejemplo 10) y se deja durante 3 días a 2^a y después 5 horas a temperatura de ambiente. Se evapora entonces hasta secar y el residuo se lava a fondo con mucho éter y éster acético al mismo tiempo que se frota. El derivado nonadecapeptúrico en bruto, protegido, contiene aún algo de derivado pentadecapeptúrico.

20. La disociación de los grupos BOC y éster t-butílico y la transformación en la forma de acetato se efectúa como en el ejemplo 7. El nonadecapepturo libre así obtenido posee las mismas propiedades como el producto descrito en el ejemplo 7.

- 25.



N O T A

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 el invento corresponde a unas solicitudes de patente presentadas en Suiza con fecha 29 de julio de 1960, nº 8658/60; 24 de octubre de 1960, nº 11882/60; 17 de noviembre de 1960, nº 12903/60; 6 de diciembre de 1960, nº 13641/60; y 27 de junio de 1961, nº 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: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE POLIPEPTUROS NUEVOS"; caracterizándose por lo siguiente:

1ª.- Procedimiento para la obtención de polipepturos nuevos caracterizado porque en forma en si conocida se preparan los nonadecapepturos de la fórmula L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-(X)-L-glutamilo-(ó L-glutaminilo)-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-L-lisilo-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina, donde X representa un ácido α -alquilo bajo- α -aminoacético con máximo 6 átomos de carbono sustituido por un grupo mercapto- o alquilo bajo mercapto o su resto de sulfóxido o sulfono, sus derivados y sales.

2ª.- Procedimiento, según la reivindicación 1ª,



20048

- caracterizado porque los ácidos amínicos L-serina, L-tirosina, L-serina, L-(X), L-aglutamina, L-histidina, L-fenilalanina, L-arginina, L-triptofano, glicina, L-lisina, L-prolina, L-valina, glicina, L-lisina,
5. L-lisina, L-arginina y L-prolina se ligan en la secuencia indicada como sigue=
- a) mediante reacción de una molécula de un ácido amínico resp. pepturo en forma de un éster con grupo amínico libre con otra molécula de ácido amínico
10. o pepturo que contenga un grupo amínico protegido, en presencia de un medio de condensación ó
- b) mediante reacción de un éster del ácido amínico resp. pepturo con grupo amínico libre con un ácido amínico resp. un pepturo con grupo carboxílico
15. activado y grupo amínico protegido ó
- c) mediante reacción de un ácido amínico resp. pepturo con grupo carboxílico libre y grupo amínico protegido con un ácido amínico resp. un pepturo con grupo amínico activado y grupo carboxílico protegido.
20. 3ª.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque el decapepturo de la fórmula L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-(X)-L-glutaminilo-(ó glutamilo)-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicina, donde el grupo α -amínico y, en
25. caso dado, un grupo mercapto libre están protegidos se condensa con el nonapepturo de la fórmula L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-L-lisilo-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina, donde los grupos ϵ -amínicos están protegidos y, en los nonadecapepturos obtenidos se
30. liberen los grupos protegidos.



263418

- 4^a.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1^a - 3^a, caracterizado porque el butilo terc.-oxicarbonilo-L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-metionilo-L-glutaminilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicina se condensa con N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-N-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-N^ε-butilo terc.-oxicarbonilo-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina y se liberan los grupos amínicos.
- 5.
10. 5^a.- Procedimiento, según la reivindicación 4^a, caracterizado porque el nonapepturo se emplea en forma de su éster butílico terc. y la condensación se efectúa en presencia de un carbodiimida.
15. 6^a.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1^a y 2^a, caracterizado porque el tetrapepturo L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-(X), donde el grupo α-amínico, y en caso dado un grupo mercapto libre, están protegidos, se condensa con el éster pentadecapeptúrico éster de la L-glutamilo- (ó glutaminilo)-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-L-glicilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-L-lisilo-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina, cuyos grupos ε-amínicos están protegidos.
- 20.
25. 7^a.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1^a, 2^a y 6^a, caracterizado porque el azuro butilo terc.-oxicarbonilo-L-serilo-L-tirosilo-L-serilo-L-metioninico se condensa con éster butílico terc. de la γ-butilo terc.-N-glutamilo-L-histidilo-L-fenilalanilo-L-arginilo-L-triptofilo-glicilo-L-lisilo-L-prolilo-L-valilo-glicilo-
30. L-lisilo-L-lisilo-L-arginilo-L-arginilo-L-prolina,



269418

cuyos grupos Σ -amínicos están protegidos.

5. 8ª.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1ª - 7ª, caracterizado porque los grupos Σ -amínicos de la lisina se protegen por el resto butilo terc.-oxicarboñílico.

9ª.- Procedimiento para la obtención de polipepturos nuevos; tal y como queda substancialmente descrito en la presente memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

10. Esta memoria consta de cincuenta y una hoja escrita a máquina por una sola cara.

Madrid,

SIBA SOCIETE ANONYME.

GÓMEZ ACEBO Y MODER