

PATENTE DE INVENCION

CIBA Case 4664/1+2



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento para la obtención de polipéptidos nuevos".¹

=====

Solicitante:

CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza, residente en
BASILEA, Suiza.

=====

El objeto de la invención es la obtención de un heneicosapéptido nuevo de la fórmula L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutaminil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-

5.



272025

5. arginil-L-prolil-L-valil-L-lisina, así como el correspondiente compuesto que, en lugar del resto glutaminílico, muestre el resto del ácido glutámico, y de sus derivados y sales de adición de ácido.
10. Bajo derivados se han de entender, ante todo, los derivados funcionales, tales como el éster, amidas, hidracidas, además los productos de N-sustitución, tal como los derivados N-acílicos, especialmente N-acetílicos y los compuestos que muestran los amino-protectores usuales.
15. Los nuevos compuestos tienen una elevada eficacia adrenocorticotrópica y se han de emplear, por lo tanto, como medicamentos en la medicina humana y veterinaria. Además, se pueden emplear como productos intermedios para la obtención de medicamentos que muestran una cadena más larga de ácido amínico, tal como las mismas hormonas adrenocorticotrópicas.
20. Los nuevos heneicosapéptidos se obtienen según los métodos conocidos para la obtención de los péptidos, ligándose los ácidos amínicos en la secuencia mencionada individualmente o después de la formación previa de unidades de péptido más pequeñas. Así se puede ligar una de las moléculas del ácido amínico, respecto péptido, en forma de un éster con otra molécula de ácido amínico respecto de péptido que contenga un grupo amínico protegido, en presencia de un medio de condensación,
25. tal como un carbodimida o un halogenuro del éster
- 30.



272025

- del ácido fosfórico, ó con éster del ácido amínico respecto péptido, con grupo amínico libre, se puede reaccionar un ácido amínico respecto un péptido con grupo carboxílico activado (y grupo amínico protegido), por ejemplo un halogenuro, azuro, anhídrido, imidazoluro de ácido, un éster enólico según Woodward (J. Am. Chem. Soc. 89, 1011 /1961/) o un éster activado, tal como éster cianmetílico o éster carboximetiltiólico. Al revés se puede también hacer reaccionar un ácido amínico respecto un péptido, con grupo carboxílico libre, (y grupo amínico protegido) con un ácido amínico respecto un péptido con grupo amínico activado (y grupo carboxílico protegido), por ejemplo un amida fosfítica.
5. Todos los métodos mencionados se pueden emplear para cada una de las formaciones de compuestos péptidicos que, según la presente invención, entran en consideración, pero los procedimientos mencionados en los ejemplos son especialmente ventajosos.
- 10.
- 15.
- 20.

- Como ya se ha indicado, existen varias posibilidades para la síntesis del heneicosapéptido de los distintos ácidos amínicos respecto unidades peptídicas más pequeñas. Un procedimiento consiste por ejemplo en que el nonapéptido L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutaminil- (ó glutamil)-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolina se condensa con el dipéptido L-valil-L-lisina, tal como muestra por ejemplo el
- 25.
- 30.

272025



esquema Figura 1. Para los ácidos amínicos se emplean las siguientes abreviaciones:

	H-Arg-OH	= L-arginina
	H-Glu-OH	= ácido L-glutamínico
5.	H-Glu(NH ₂)-OH	= L-glutamina
	H-Gly-OH	= glicina
	H-His-OH	= L-histidina
	H-Lys-OH	= L-lisina
	H-Met-OH	= L-metionina
10.	H-Phe-OH	= L-fenilalanina
	H-Pro-OH	= L-prolina
	H-Ser-OH	= L-serina
	H-Try-OH	= L-triptofano
	H-Tyr-OH	= L-tirosina
15.	H-Val-OH	= L-valina.

20. BOC significa un grupo butilo terciario-oxycarbonílico. El nonadecapéptido empleado como material de partida se puede obtener según el procedimiento de la solución nº 269.418 (case 4587/1-5).

25. El henecosapéptido se puede obtener además mediante síntesis escalonada según el esquema de la Figura 2 partiendo del extremo carboxílico del dipéptido L-valil-L-lisina y los distintos ácidos amínicos, El derivado dipeptídico, éster L-valil-N^ε-p-fenil-azo-benciloxicarbonil-L-lisil-nitrobencílico, se puede obtener por ejemplo por condensación de BOC-L-valina con éster N^ε-p-fenilazo-benciloxicarbonil-L-lisina-p-nitrobencílico según el método carbodiimídico o anhídrido.

30.

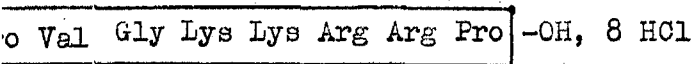
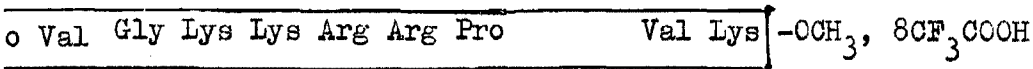
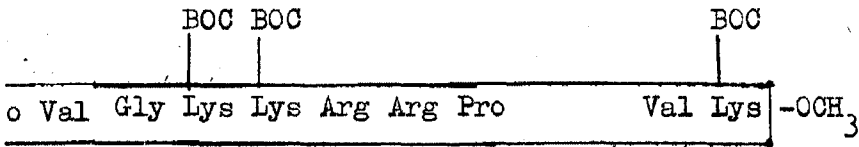
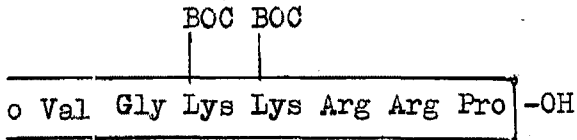
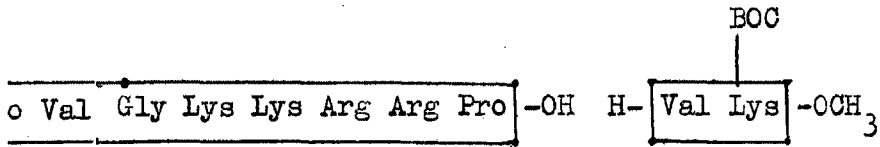
272025



- Los grupos funcionales, libres, que no participan en la reacción, se protegen convenientemente, especialmente por hidrólisis o reducción de restos fácilmente dissociables, el grupo carbo-
5. xílico preferentemente por esterización, por ejemplo con metanol, butanol terciario, alcohol bencílico, alcohol p-nitrobencílico, el grupo amínico por ejemplo por introducción del resto tosílico (= TOS), tritílico (= TRI) o del grupo carbobenzoxi (= Z) o grupos protectores coloreados, tal
10. como por ejemplo el grupo p-fenilazo-benciloxicarbónico (= PZ) y el grupo p-(p'-metoxi-fenilazo)-benciloxicarbónico (= MZ) o especialmente del resto butilo terciario-oxicarbónico, Para la protección del grupo amínico en la agrupación guanídica de la arginina es adecuado el grupo nitro; el mencionado grupo amínico de la arginina no es, sin embargo, necesario que se proteja durante la reacción.
- 15.

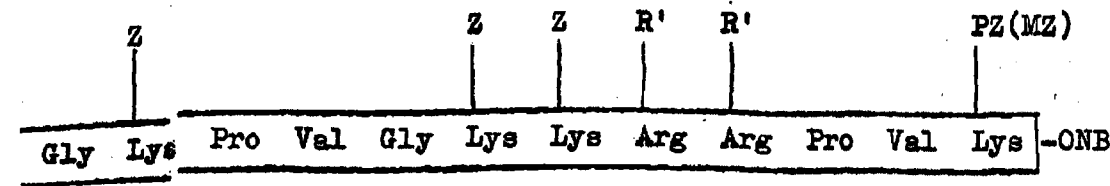
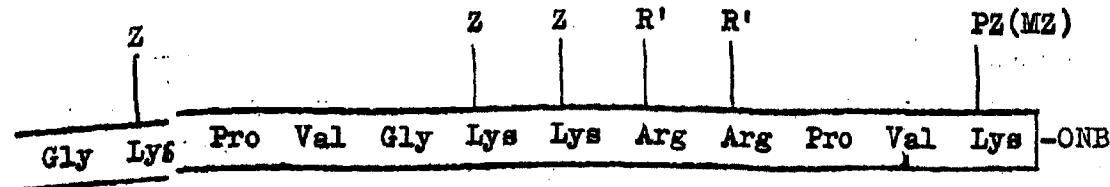
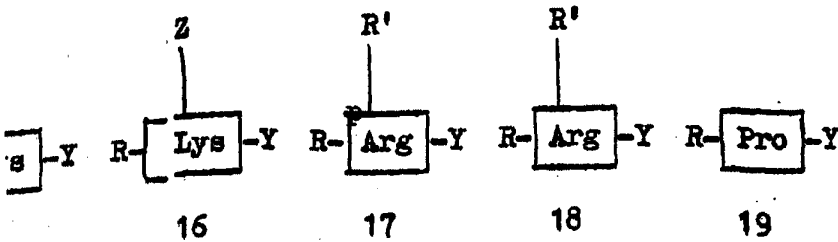
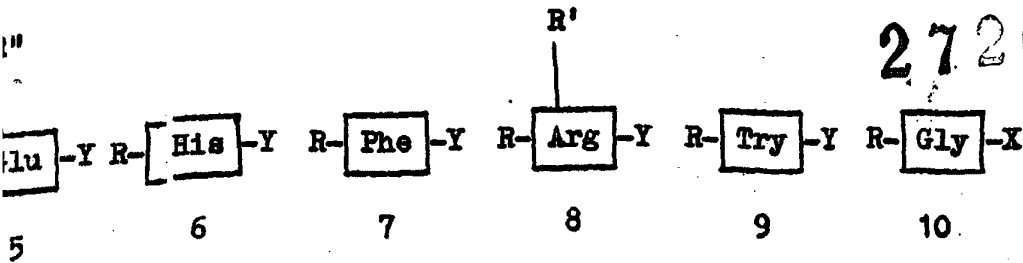
6 Bis

125



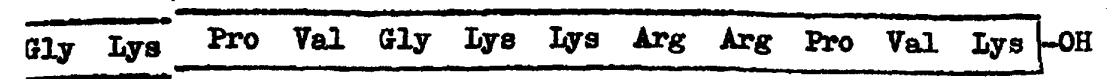
7 Bis

272025



$\downarrow \text{H}^{\oplus}$ - Catalisis ó electrolisis (para $R' = \text{NO}_2$)

Fig. 2



$-\text{NO}_2$ o di-carbobenzoxi, $R'' = \text{OBz}$ ó ONB ; $R = \text{TRI}$,
 el último caso disociación por hidracina);
 do, azuro, amida activada.
 r active

272025



- 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 grupo carboxílico libre en el transcurso del procedimiento para la obtención de los nona-decapéptidos y productos intermedios se efectúa, según métodos en si ya conocidos, mediante tratamiento con medios hidrolizantes respecto reductores.
- 5.
10. La invención se refiere también a aquellas formas de ejecución del procedimiento en que se parte de un compuesto que se obtiene en cualquier etapa del procedimiento como producto intermedio y se efectúan las etapas del procedimiento que faltan o el procedimiento se interrumpe en cualquier etapa, así como los productos intermedios que así se obtienen.
- 15.
- Según el modo de trabajo se obtienen los nuevos compuestos en forma de bases o de sus sales.
20. De las sales se pueden obtener en forma conocida las bases. De estas últimas se pueden obtener, por reacción con ácidos adecuados para la obtención de sales de aplicación terapéutica, las sales, tal como por ejemplo aquellas con ácidos inorgánicos, tal como ácidos halogenohidrogénicos, por ejemplo ácido clorhídrico o ácido bromohidrogénico, ácido nítrico, ácido tiociánico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ó con ácidos orgánicos, tal como ácido acético, propiónico, glicólico, láctico, pirogálico, oxálico, cítrico, benzoico, cinamónico, salicí-
- 25.
- 30.

272025



lico, 2-fenoxi- ó 2-acetoxi-benzoico, amigdálico, ácido metanosulfónico, etanosulfónico, hidroxietanosulfónico, benzol- ó toluenosulfónico.

5. Los heneicosapéptidos obtenidos según la presente invención se pueden emplear en forma de preparados farmacéuticos. Estos contienen a los péptidos en mezcla con un material vehículo farmacéutico orgánico o inorgánico, adecuado para la aplicación enteral o parental. Como tales entran
10. aquellos materiales en consideración que no reaccionen con los polipéptidos, tal como por ejemplo gelatina, lactosa, glucosa, sal común, almidón, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma, glicoles polialquilénicos,
15. vaselina, colesteroína u otros vehículos medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar por ejemplo, como tabletas, grageas, polvos, ungüentos, cremas, supositorios, o en forma líquida como soluciones, suspensiones o emulsiones.
20. En caso dado estarán esterilizadas y/o contendrán materias auxiliares, tales como medios de conservación, estabilización, reticulación o emulsión. También pueden contener otros materiales terapéuticamente de valor.
25. La invención se describe en los ejemplos siguientes. Las temperaturas están indicadas en grados Centígrados.

EJEMPLO 1:

30. 27,06 mg (0,01 mMol) de hexaacetato de L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutaminil-

272025



- L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolina (véase sol. nº 269,418 - Case 4587/1-5) se disuelven en 1 ml
5. de agua y se mezcla con 1 ml de dioxano y 0,4 ml de sosa cáustica 0,1-n. Se enfría a 0°. Después de agregar 8,58 mg de azuro t-butiloxicarbonílico (0,06 μ Mol) se agregan, en el transcurso de 6 horas, 0,6 ml de sosa cáustica 0,1-n, agitando, en
10. porciones muy pequeñas. Después de otras 15 horas se evapora la solución, después de agregar 0,4 ml de ácido clorhídrico 0,1-n, en vacío hasta secar, el residuo se disuelve en agua y se liofiliza. El residuo incoloro, bien secado, se disuelve en 1 ml
15. de formamida dimetílica y después de agregar 35,9 mg (0,1 mMol, 10 veces exceso) de éster metílico de la L-valil-N^t-t-butiloxicarbonil-L-lisina se enfría a -5°. Esta solución se mezcla con 20,6 mg de carbodiimida dicitclohexílica y se guarda durante 15 horas.
- 20.

Entonces se concentra por evaporación en vacío cuidadosamente la solución hasta aproximadamente la mitad y se mezcla con 10 litros de éster acético secado. Se precipita aquí el derivado heptacosapeptídico como polvo insoluble, incoloro y los excesos en carbodiimida dicitclohexílico y éster

25. dispeptídico se disuelven. El producto se vuelve dos veces a disolver y precipitar.

Sin tener en consideración las pequeñas impurezas por la urea dicitclohexílica se disuelve

30.



972025

- el compuesto en 0,5 ml de ácido trifluoroacético y allí se guarda durante 1 hora a temperatura de ambiente. Después de evaporar el disolvente se obtiene el heneicosapéptido-Glu⁵- γ -amida-lys²¹-éster metílico-octa-trifluoroacetato en forma electrofóticamente pura (electrofóresis de papel a 3000 V, pH 1,9). Este muestra un considerable efecto corticotropínico. Rendimiento 95 %.
- 5.
- Las funciones de amida y éster se saponifican guardándolas en solución ácido clorhídrico 0,1-n durante 24 horas a temperatura de ambiente, después de haber intercambiado los restos de trifluoroacetato pasando por una columna de amberlita IR-4B (forma acetato) por los restos de acetato.
- 10.
- Liofilizando se obtiene el heneicosapéptido en forma de octa-hidrocloruro. Rendimiento 84 %. Muestra un gran efecto corticotropínico.
- 15.
- El derivado dipeptídico éster metílico de la L-valil-N^ε-t-butiloxicarbonil-L-lisina se obtiene de la forma siguiente:
- 20.
- Carbobenzoxi-L-valina y N^ε-t-butiloxicarbonil-L-lisina-éster metílico (Sol. Belga nº 472.340 - Case 4351/1-3, ejemplo 3) se disuelven en proporción 2,51 g a 2,60 g en 50 ml de acetonitrilo y a -5° se mezcla con 2,06 g de carbodiimida dicitclohexílica. Después de 3 horas se ha precipitado el 90 % de la urea dicitclohexílica esperada. Esta se filtra, el filtrado se evapora hasta secar, el residuo se disuelve en éster acético y se lava con ácido clorhídrico frío, diluido, solución de carbonato
- 25.
- 30.

272 025



5. potásico y agua. Después de secar con sulfato sódico y evaporar el disolvente se obtienen 4,0 g (81 %) de éster metílico de la carbobenzoxi-L-valil-N^ε-t-butiloxicarbonil-L-lisina como aceite viscoso.
10. El grupo carbobenzoxi se disocia mediante hidrización de 4,0 g del compuesto de arriba en 100 ml de metanol y 8 ml de ácido clorhídrico 1-n en presencia de 0,5 g de catalizador de Pd-carbón al 10 %. Después de 40 minutos, al perlar a través Hidrógeno, no se desarrolla más dióxido de carbono. El catalizador se filtra y el filtrado se evapora cuidadosamente en vacío. El residuo se agita inmediatamente con 10 ml de éster acético y 10 ml de solución de carbonato potásico, con lo que el éster dipeptídico libre se disuelve en la capa orgánica. Esta se separa y se seca con carbonato potásico sólido. Después de evaporar el éster acético queda el éster metílico de la L-valil-N^ε-t-butiloxicarbonil-L-lisina como aceite viscoso que se ha de elaborar inmediatamente.
15. EJEMPLO 2:
20. 1) H-Lys(PZ)-OBzy, HCl
25. 3,84 g de N^ε-PZ-lisina se suspenden en 38 ml de tetrahidrofurano absoluto y, durante una hora, se trata con fosgeno a 40°. La solución clara se evapora en vacío a 40°, el residuo cristalino se calienta con 20 ml de alcohol bencílico absoluto, conteniendo 0,73 g de gas de ácido clorhídrico, durante 3 minutos a 60°, con lo que se forma una
- 30.

2720470



- solución clara. Después de enfriar a temperatura de ambiente se mezcla con 60 ml de éter absoluto con lo que cristaliza el hidrocioruro. Rendimiento: 4,19 g = 82 % de la teoría. P.F. 188-190° bajo descomposición. Para el análisis se recrystaliza de metanol-éter. P.F. 191° bajo descomposición.
5. En forma análoga se obtienen el hidrocioruro del éster bencílico de la N^ε-MZ-L-lisina así como el correspondiente derivado del éster p-nitrobencílico. Su ulterior elaboración es igual a la del hidrocioruro del éster bencílico de la N^ε-PZ-L-lisina.
10. 2) BOC-Val-Lys(PZ)-OBzy
- 2,64 g del HCl del éster bencílico de la N^ε-PZ-lisina se disuelven en cloroformo y poco metanol y a 0° se agita con solución de carbonato potásico. Después de secar con sulfato sódico se evapora el disolvente en vacío a 40°, el residuo cristalizado se disuelve junto con 1,12 g de BOC-valina en 14 ml de acetonitrilo y a 0° se mezcla con 1,17 g de carbodiimida dicitclohexílica. Después de dejar reposar durante la noche a 0° se filtra en vacío la precipitación y se lava con acetonitrilo frío como el hielo. El péptido se cristaliza con la urea dicitclohexílica. Mediante extracción con formamida dimetílica se separa el péptido de la urea, de la formamida dimetílica cristaliza éste después de agregar agua. Rendimiento 2,50 g = 72 %; P.F. 154-156°.
15. 20. 25. 30. Para el análisis se recrystaliza de eta-

150



272025

nol-agua.

3) H-Val-Lys(PZ)-OBzy, HCl

5. 2,02 g de éster bencílico de la BOC-valil-N^ε-PZ-lisina se disuelven en 26 ml de éster acético absoluto, se mezcla con 40 ml de ácido clorhídrico 3,3-n en éster acético y se guarda durante 1 hora a temperatura de ambiente. Al evaporar el disolvente en vacío a 40° se precipita el hidrocloreuro en forma sólida. Rendimiento: 1,78 g = 97 %; P.F. 200-201° bajo descomposición.
- 10.

El éster dipeptídico se puede condensar en la forma indicada en la Figura 2 con otros ácidos amínicos al heneicosapéptido.

4) BOC-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

15. 2,8 g de BOC-Pro-OH se disuelven en 17 ml de tetrahidrofurano absoluto y 1,8 ml de amina trietilica y a -15° se mezcla con 1,6 ml de cloruro pivaloílico. Se deja agitando durante 15 minutos a -15°. Mientras tanto se prepara, de 7,93 g de H-Val-Lys(PZ)-OB, HCl en formamida dimetilica y amina trietilica, el H-Val-Lys(PZ)-OB y esta solución se agrega al anhídrido mixto de arriba. La mezcla se guarda durante la noche a 0°, se diluye entonces con éster acético y a 0° se agita con ácido clorhídrico diluido y solución de bicarbonato sódico.
20. Después de evaporar el disolvente se recristaliza el residuo de etanol-agua. Rendimiento 8,8 g = 88 % de la teoría; P.F. 123-125°.
- 25.

5) H-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy, HCl

30. El derivado tripeptídico se obtiene por

272025



descarbenzoxilización como descrito bajo 3). Después de recristalizar de metanol-éter funde la sustancia a 218-219°.

6) BOC-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

5. 1,15 g de N^d-BOC-N^E-di-carbobenzoxi-L-arginina se disuelven en 11 ml de tetrahidrofurano absoluto y 0,29 ml de amina trietilica. A -15° se agregan 0,28 ml de éster isobutílico del ácido clorocarbónico y se agita durante 15 minutos a -15°. Se
10. agrega una solución de 1,00 g de H-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy, HCl en 4 ml de formamida dimetilica absoluta y 0,2 ml de amina trietilica. Después de agitar a 0° se guarda durante la noche a 0°, después se diluye con éster acético, a 0° se lava con ácido clorhídrico e hidrogenocarbonato sódico, se seca y el disolvente se evapora en vacío. El éster N^d-BOC-N^E-dicarbobenzoxi-Arg-Pro-Val-Lys(PZ)-benzílico se compone de una espuma sólida no cristalizable. Rendimiento 1,69 g = 100 % de la teoría.
15. El producto es cromatográficamente, en capa delgada, unitario en el sistema cloroformo-acetona (7:3) Ref. 0,53 y benzol-acetona (1:1) Ref. 0,67.
- 20.

7) H-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

25. 1,2 g de BOC-tetrapéptido se dejan reposar con 7,5 ml de ácido trifluoroacético durante 10 minutos; después de evaporar el ácido trifluoroacético disuélvese el aceite en cloroformo, a 0° se lava con agua y después con solución de carbonato potásico, se seca y el disolvente se evapora en vacío.
- 30.

272 025



Se obtienen 990 mg = 90 % de la teoría de una espuma naranja sólida. La substancia es cromatográficamente, en capa delgada, unitaria; en el sistema benzol-acetona (1:1) Ref. 0,09 y dioxano-agua (9:1) Ref. 0,71.

5.

8) BOC-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

El derivado pentapeptídico de arriba se prepara de 1,72 g de BOC-Arg(Z₂) y 2,175 g de H-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy en forma análoga como descrito bajo 6). Rendimiento 3,12 g = 97 % de la teoría.

10.

Cromatograma de capa delgada: en benzol-acetona (1:1) Ref. 0,71, en cloroformo-acetona (7:3) Ref. 0,57.

15.

9) H-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

De 3,12 g del derivado BOC-pentapeptídico de arriba se disocia el grupo BOC en igual forma a como descrito en el ejemplo 7). Rendimiento 2,90 g = 99 % de la teoría.

20.

Cromatograma de capa delgada: unitario. Ref. 0,48 en benzol-acetona (1:1) y 0,18 en cloroformo-acetona (7:3).

10) BOC-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

587 mg del producto descrito bajo 9) se reaccionan con 235 mg de BOC-Lys(Z)-OH en forma análoga a como descrito bajo 6). El producto en bruto se disuelve y precipita de tetrahidrofuranó-éter. Rendimiento: 725 mg = 100 % de la teoría.

25.

Cromatograma de capa delgada: en benzol-acetona (1:1) Ref. 0,68, en cloroformo-acetona (7:3)

30.



272025

Ref. 0,36.

11) H-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

De 614 mg de BOC-Hexapéptido se disocia, en forma análoga a como descrito en 7), el frupo

5. BOC. Rendimiento: 574 mg = 99 %.

Cromatograma de capa delgada: benzol-acetona (1:1) Ref. 0,38; cloroformo:acetona (7:3) Ref. 0,11.

12) BOC-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

10.

3,26 g de H-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy y 1,19 g de éster BOC-Lys(Z)-nitro-fenílico se agitan en 7 ml de tetrahidrofurano durante la noche a 40°. La mezcla espesa se disuelve en poco formamida dimetíllica y se gotea en 300 ml de éter-éter de petróleo 2:1. La precipitación se filtra en vacío y se lava bien con éter. Rendimiento 3,45 g = 88 %.

15.

Cromatograma de capa delgada: benzol-acetona (1:1) Ref. 0,57 unitario; cloroformo-acetona (7:3) Ref. 0,22 unitario.

20.

13) H-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

De los 3,45 g de derivado peptídico de arriba se disocia el grupo BOC como descrito bajo 7). Rendimiento: 3,20 g = 97 % de la teoría.

25.

Cromatograma de capa delgada: benzol-acetona (1:1) Ref. 0,32; cloroformo-acetona (7:3) Ref. 0,09.

30.

14) BOC-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-



272 025

Val-Lys(PZ)-OBzy

- De los 3,20 g de derivado heptapeptídico de arriba y 686 mg de BOC-Val-Gly-OH se prepara, según el procedimiento descrito bajo 6), el éster nonapeptídico protegido. Este se limpia mediante solución y precipitación de formamida dimetílica/éter. Rendimiento 2,92 g = 81 % de la teoría.
5. Cromatograma de capa delgada: benzol-acetona (1:1) Ref. 0,34; dioxano Ref. 0,72.
10. El BOC-Val-Gly-OH se obtiene de la manera siguiente:
- de 5 g de BOC-valina y 3,54 g de hidrocloreuro del éster etílico de glicina se prepara, según el método descrito bajo 4), el BOC-Val-Gly-OEt. Rendimiento 4,45 g = 64 % de la teoría. P.F. 95-96° después de la cristalización de ligroina.
15. 4,3 g del éster etílico se saponizan en 80 ml de dioxano con 32 ml de sosa caústica durante 30 minutos. Después de concentrar por evaporación el disolvente se cubre con una capa de éster acético, se acidifica a 0° con ácido clorhídrico concentrado y se extrae con éster acético. Después de lavar neutro y evaporar quedan 3,90 g de una resina = 100 % de la teoría. La sal dicitclohexilamínica de ello cristaliza a F. 167-169°.
20. 25. 15) H-Val-Gly-Lys(Z)-Lis(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy
- De 2,92 g del éster BOC-nonapeptídico se disocia, como descrito bajo 7), el grupo BOC. Rendimiento 2,54 g = 91 % de la teoría.
- 30.

272025



Cromatograma de capa delgada: cloroformo-metanol (9:1) Ref. O,4.

16) BOC-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

5. 2,985 g del éster nonapeptídico se reaccionan con 466 mg de BOC-prolina según el método descrito bajo 6). El producto en bruto obtenido se disuelve y precipita de formamida dimetílica-éter éter de petróleo. Rendimiento 2,70 g = 83 % de la teoría.

Cromatograma de capa delgada: cloroformo-metanol (9:1) Ref. O,9.

17) H-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

15. 2,30 g de éster BOC-decapeptídico se tratan, como descrito bajo 5), con ácido trifluoroacético. Rendimiento 2,108 g = 96 % de la teoría.

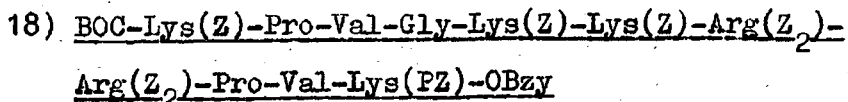
20. Como debido a la solubilidad cada vez menor la cromatografía de capa delgada sólo se puede realizar con dificultad, se emplea el siguiente método para la comprobación de la pureza:

25. Algunos mg de la sustancia de arriba se disuelven en formamida dimetílica, se mezcla con 1 gota de amina trietílica y algunos mg de 2,4-dinitrofluorobenzol. Después de reposar durante la noche, a temperatura de ambiente, se precipita el péptido. dinitrofenílico con éter, se centrifuga y se hidroliza totalmente con ácido clorhídrico. Los ácidos dinitrofenilamínicos se investigan cromatográficamente. Se descubrió solo dinitrofenil-prolina
- 30.

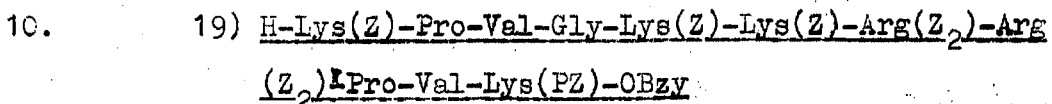


272025

soluble en éter.

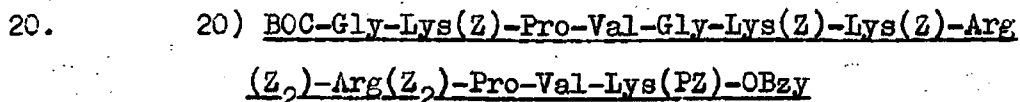


5. 2,10 g de éster decapeptídico y 700 mg de éster BOC-Lys(Z)-nitrofenílico se guardan en 5 ml de formamida dimetílica durante 2 días a temperatura de ambiente y durante 12 horas a 45°. Goteando en 250 ml de éter se precipita el derivado undecapeptídico. Rendimiento 2,255 g = 93 %.

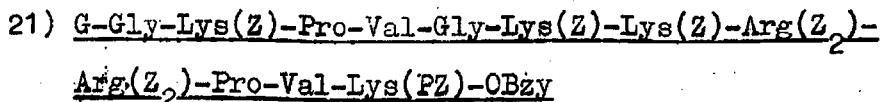


El producto de arriba se trata de acuerdo con el método descrito bajo 7). Rendimiento 2,08 g = 96 % de la teoría.

15. Dinitrofenilación: ejecutada como descrito bajo 17). En este ensayo no se obtienen ácidos dinitrofenilamínicos solubles en éter, solo se encuentra la 4-dinitrofenil-lisina soluble en agua.



25. 1,68 g del producto obtenido bajo 19) se reaccionan con 230 mg de BOC-glicina según el método descrito bajo 6). Rendimiento 1,725 g = 97 % de la teoría.



30. 1,725 g de éster BOC-dodecapeptídico se tratan según el método descrito bajo 7). Rendimiento 1,592 g = 96 % de la teoría.

272025



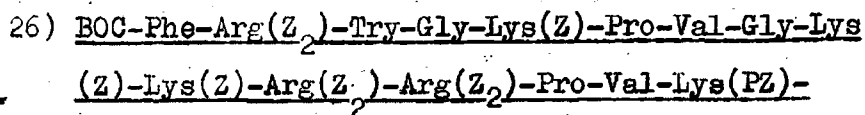
Dinitrofenilación: Se encuentra solo dinitrofenil-glicina soluble en éter, ningún ácido dinitrofenileamínico soluble en agua.

5. 22) BOC-Try-Gly-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy
3,85 g de derivado del éster dodecapeptídico y 1,12 g de BOC-triptofano se reaccionan según el método descrito bajo 6). El producto se limpia disolviendo y precipitando de formamida dimetílica-éter. Rendimiento 4,11 g de éster tridecapeptídico protegido = 96 % de la teoría.
10. 23) H-Try-Gly-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy
4,0 g del producto de arriba se tratan según el método descrito bajo 7). Rendimiento 3,86 g = 100 % de la teoría.
15. 24) BOC-Arg(Z₂)-Try-Gly-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy
Los 3,86 g de éster peptídico de arriba se reaccionan con 2,37 g de BOC-Arg(Z₂)-OH según el método descrito bajo 6). Se disuelve y precipita de formamida dimetílica-éter. Rendimiento: 4,40 g de éster tetradecapeptídico protegido = 96 % de la teoría.
20. 25) H-Arg(Z₂)-Try-Gly-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy
4,30 g del compuesto BOC de arriba se tratan como descrito bajo 7). Rendimiento 4,15 g = 99 % de la teoría.
30. Dinitrofenilación: cromatograficamente

272025



solo se encuentra dinitrofenil-arginina soluble en agua.

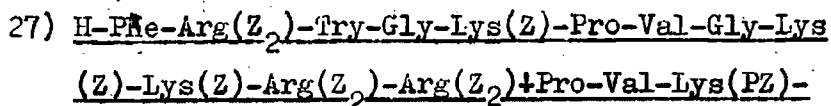


5.

OBzy

De 4,15 g del producto de arriba y 2,14 g de éster BOC-fenilalanina-p-nitrofenílico se obtienen, según el método descrito bajo 18), 4,25 g de éster pentadecapeptídico protegido = 95 % de la teoría.

10.



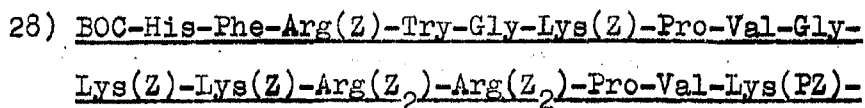
OBzy

De 4,18 g del compuesto BOC de arriba se obtienen, según el método descrito bajo 7), 4,14 g del derivado del éster pentadecapeptídico = 102 % de la teoría.

15.

Dinitrofenilización: Se obtiene solo el dinitrofenilo-fenilalanina soluble en éter.

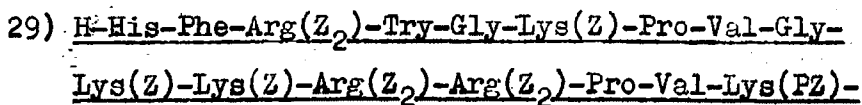
20.



OBzy

De 4,14 g del producto de arriba y 1,30 g de BOC-histidina se obtienen, según el método descrito bajo 6), 4,13 g (= 97 % de la teoría) de éster hexadecapeptídico protegido.

25.



OBzy

30.

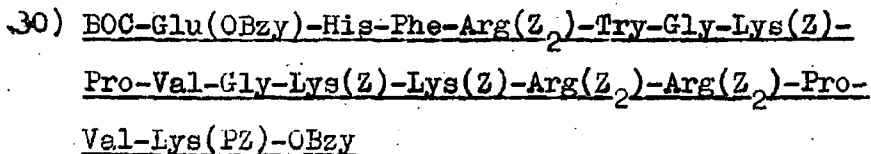
De 4,20 g del compuesto BOC de arriba se

272025



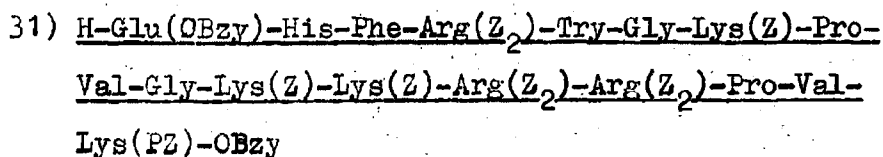
obtienen, según el método descrito bajo 7), 3,90 g de éster hexadecapeptídico libre de BOC = 95 % de la teoría.

5.



De los 3,90 g de arriba y 1,5 g de éster γ -bencílico del ácido BOC-glutamínico se obtienen según el método descrito bajo 6) 3,93 g del éster del heptadecapeptido protegido. Rendimiento 92 % de la teoría.

10.

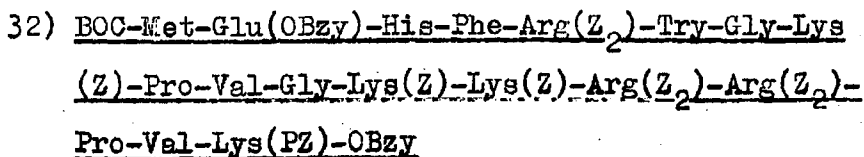


15.

De 1,954 g del compuesto de arriba se obtienen, según el método descrito bajo 7), 1.957 g de éster heptadecapeptídico libre de BOC (100 % de la teoría).

20.

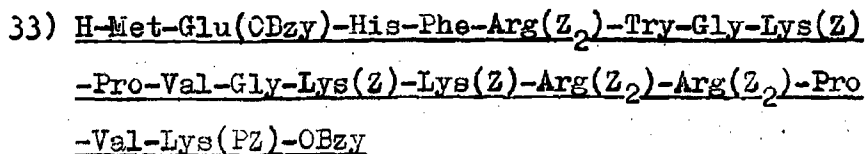
Dinitrofenilación: solo se encuentra ácido dinitrofenilglutamínico.



25.

De 2,00 g del éster peptídico de arriba y 752 mg de BOC-metionina se prepara según el método descrito bajo 6) el éster octadecapeptídico protegido. Rendimiento: 1,91g = 90 % de la teoría.

30.





1,87 g del producto de arriba se tratan, según el método descrito bajo 7). Rendimiento 1,88 g de éster octadecapeptídico libre de BOC = 100 % de la teoría.

- 5. 34) BOC-Ser(Bzy)-Met-Glu(OBzy)-His-Phe-Arg(Z₂)-Try-Gly-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

1,88 g del producto de arriba y 797 mg de BOC-serina (Bzy) se reaccionan según el método descrito bajo 6). Rendimiento 1,847 g de éster nonadecapeptídico protegido = 92 % de la teoría.

10.

- 35) H-Ser(Bzy)-Met-Glu(OBzy)-His-Phe-Arg(Z₂)-Try-Gly-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

15.

El tratamiento de 1,826 g del producto de arriba, según el método descrito bajo 7), da 1,82 g de éster nonadecapeptídico libre de BOC = 100 % de la teoría.

20.

- 36) BOC-Tyr(Bzy)-Ser(Bzy)-Met-Glu(OBzy)-His-Phe-Arg(Z₂)-Try-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

1,82 g del producto de arriba se reaccionan con 1075 mg de BOC-Tyrosina (Bzy) según el método descrito bajo 6). Rendimiento 1,90 g de éster eicosapeptídico protegido = 96 % de teoría.

25.

- 37) H-Tyr(Bzy)-Ser(Bzy)-Met-Glu(OBzy)-His-Phe-Arg(Z₂)-Try-Gly-Lys(Z)-Pro-Val-Gly-Lys(Z)-Lys(Z)-Arg(Z₂)-Arg(Z₂)-Pro-Val-Lys(PZ)-OBzy

1,885 g del compuesto BOC de arriba se tratan según el método descrito bajo 7). Rendimien-

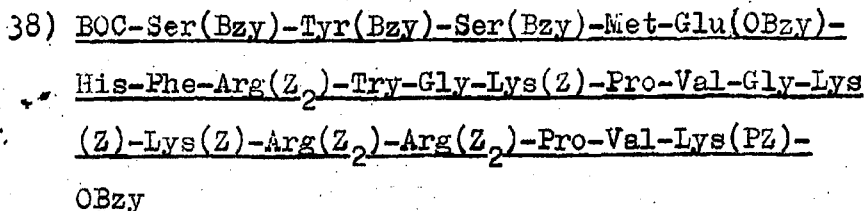
30.

15/10



272 025

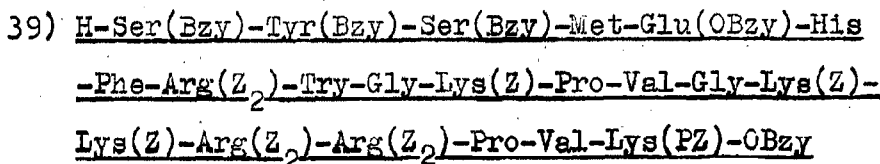
to: 1,91 g del éster eicosapeptídico libre de BOC = 100 % de la teoría.



5.

1,91 g del éster peptídico de arriba y 825 mg de BOC-serina (Bzy) se reaccionan según el método descrito bajo 6). Rendimiento: 1.903 g de éster heneicosapeptídico protegido = 94 % de la teoría.

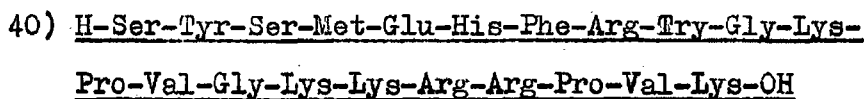
10.



15.

De 1,875 g del compuesto BOC de arriba se disocia por tratamiento con ácido trifluoroacético, de acuerdo con el método descrito bajo 7), el grupo BOC. El producto en bruto se obtiene en forma de polvo disolviendo en alcohol hirviendo y enfriando. Rendimiento 1,73 g = 94 % de la teoría.

20.



259 del producto descrito bajo 39 se agitan en 1 litro de amoníaco hasta disolver. Ahora, en el punto de ebullición del amoníaco se introducen pequeños trocitos de sodio hasta que el color azul sea constante. El sodio en exceso se descompone con acetato amónico y el amoníaco se deja evaporar. El residuo se disuelve en agua, con lo que quedan 55 mg de una substancia amari-

25.

30.



lla insoluble. La solución acuosa se liofiliza y el residuo se limpia en ácido acético 0,1-n por electrofóresis de alta tensión preparativa (700 V). Las fracciones positivas según Sakaguchi se reu-
5. nen y se liofilizan. Rendimiento 75,9 mg de hexaacetato. Estas muestran efecto corticotrópico.

Los materiales de partida se obtienen como sigue:

1) N^d -BOC- N^w, N^w -dicarbobenzoxi-L-arginina

10. 2,82 g de N^w, N^w -dicarbobenzoxi-L-arginina se agita en 60 ml de dioxano y 60 ml de agua con 2,8 g de óxido de magnesio y 1,77 ml de BOZ-azuro durante la noche a 45°. El dioxano se evapora en vacío, la solución acuosa se descompone con éster acético y a 0° se acidifica con ácido clorhídrico 2-n.
15. El extracto éster acético se evapora después de lavar con agua. Residuo 2,70 g de BOC-Arg(Z₂) = 78 % de la teoría.

Para limpiar se filtra el producto a
20. través de una columna de silicagel (54 g). La sustancia eluable con cloroformo-éster acético (1:1) se recristaliza de metanol-agua. Rendimiento 2,21 g = 64 % de la teoría. P.F. 141-143°.

2) Ester p-nitrofenílico de N^d -BOC- N^f -carbobenzoxi-L-lisina

25. 12,7 g de BOC-Lys(Z) y 5,5 g de p-nitrofenil se disuelven en 65 ml de éster acético y a 0° se mezcla con 7,6 g de diimida dicitclohexilcarbónico. Después de 5 horas se aspira la urea dicitclohexílica
30. y el éster acético se evapora. El residuo se disuel-



272025

5. ve en cloruro metilénico y a 0° se extrae con solución de carbonato potásico 0,5-m. Después de lavar con ácido clorhídrico y agua y secado con sulfato sódico se evapora el disolvente y el residuo se recristaliza de etanol-agua. Rendimiento: 16,3 g de BOC-Lys(Z)-ONP = 93 % de la teoría; P.F. 91,5-92°.

3) BOC-L-Histidina

10. A una solución de 19,2 g de L-histidina-HCl en 100 ml de sosa cáustica 2-n y 200 ml de dioxano se gotean a 45° lentamente 14,6 ml de BOC-azuro y 110 ml de sosa cáustica 1-n. Después de agitar durante la noche se evapora el dioxano en vacío, la solución acuosa se extrae con éster acético y después se concentra en vacío a pocos ml.

15. La solución se cubre con una capa de butanol, se acidifica a 0° con ácido sulfúrico y se extrae varias veces con butanol. Los extractos butanólicos dejan, después de evaporar el disolvente, 15,1 g

20. = 59 % de la teoría de una resina del BOC-His que en el cromatograma de papel es unitaria. Se limpia aún disolviendo y precipitando de etanol-éter, obteniéndose un polvo amorfo muy higroscópico.

4) Ester γ -bencílico del ácido BOC-L-glutámico

25. Una suspensión de 6,9 g de éster γ -bencílico del ácido L-glutámico en 50 ml de dioxano se mezcla con 4,45 ml de BOC-azuro. A 45° se gotea agitando una solución de 6,1 g de hidrogeno-carbonato potásico en 50 ml de agua. El ácido aminos se disuelve así lentamente. Después de agitar du-

30.

15



272025

- rante la noche se evapora el dioxano en vacío, la solución acuosa se extrae con éster acético, entonces se acidifica a 0° con ácido clorhídrico y se extrae con éster acético. Después de lavar con
5. agua se lavan los extractos éster acéticos con solución de bicarbonato sódico (5 %) y agua, se seca y se evapora. El residuo se compone de un aceite no cristalizable. Rendimiento 7.9 g de BOC-Glu (OBzy) = 81 % de la teoría.
10. La sal díciclohexilamínica cristaliza prácticamente cuantitativamente de éter o éster acético y poco éter de petróleo. P.F. 145-146°.
- 5) Ester p-nitrofenílico de BOC-L-fenilalanina
- 6,2 g de BOC-L-fenilalanina, 3,9 g de
15. p-nitrofenol y 25 ml de éster acético absoluto se mezclan a 0° con 5,3 g de diimida díciclohexilcarbónico. Se deja reposar durante la noche a 0°. Calentando ligeramente se disuelve el éster nitrofenílico cristalizado, después de filtra en vacío la
20. urea díciclohexílica y el filtrado se evapora en vacío hasta secar. Después de recrystalizar de etanol se obtienen 6,1 g = 69 % de la teoría de éster nitrofenílico del P.F. 130-132°. El producto de análisis puro funde a 135°.
25. 6) BOC-O-bencil-L-serina
- 10,8 g de D-hidrógenotartrato del éster metílico de O-bencil-L-serina se mezclan con 23 ml de sosa caústica 4-n. Después de 15 minutos se ajusta la solución obtenida, con ácido acético
30. glacial, a un pH de 6. Se aspira la O-bencil-L-

272025



- serina cristalizada y se lava con agua. Rendimiento: 4,95 g = 84 % de la teoría. Este producto se disuelve en 25,4 ml de sosa cáustica 1-n y 25 ml de dioxano, a 45° se mezcla con 3,88 ml de BOC-azuro y lentamente con 28 ml de sosa cáustica. Después de agitar durante la noche se evapora el dioxano en vacío, la solución acuosa se extrae con éster acético, se acidifica entonces a 0° con ácido clorhídrico y nuevamente se extrae con éster acético. Los extractos éster acéticos se concentran por evaporación en vacío, se mezcla con 4,2 ml de amina dicitclohexílica, se hace cristalizar con éster de petróleo y la sal se filtra en vacío. Rendimiento: 8,2 g de sal dicitclohexilamínica = 68 % de la teoría. P.F. 134-135°.
- 5.
- 10.
- 15.

La sal dicitclohexilamínica se disuelve en caliente en agua, se cubre con una capa de éster acético, se enfría a 0° y se acidifica con ácido clorhídrico 2-n. La solución éster acética se vuelve a lavar con ácido clorhídrico, después con agua, se seca y se evapora. La BOC-O-bencil-L-serina forma un aceite. El rendimiento es cuantitativo.

20.

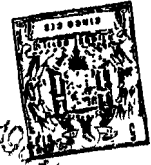
N O T A

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 este invento se refiere a una solicitud de patente

25.

30.

27202570



- presentada en Suiza con fechas 17 de noviembre de 1.960, número 12904/60, y 13 de octubre de 1.961, número 11873/61, 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 POLIPEPTIDOS NUEVOS ", caracterizándose por lo siguiente:
- 5.
10. 1ª.- Procedimiento para la obtención de polipéptidos nuevos, caracterizado, porque se prepara un heneicosapéptido de la fórmula L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutaminil-(ó glutamil)-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-
15. -glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolil-L-valil-L-lisina, sus derivados y sales.
20. 2ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 1ª, caracterizado porque los ácidos amínicos L-serina, L-tirosina-L-serina, L-metionina, L-glutamina ó ácido L-glutámico, L-histidina, L-fenilalanina, L-arginina, L-triptofano, glicina, L-lisina, L-prolina, L-valina, glicina, L-lisina, L-lisina, L-arginina, L-arginina, L-pro-
25. lina, L-valina y L-lisina se ligan en la secuencia indicada como sigue: mediante reacción de una molécula de ácido amínico respecto péptido en forma de un éster con grupo amínico libre con otra molécula de ácido amínico respecto péptido, que contenga un
30. grupo amínico protegido, en presencia de un medio



272025

- de condensación; mediante reacción de un éster del ácido amínico respecto péptido con grupo amínico libre con un ácido amínico respecto un péptido con grupo carboxílico activado y grupo amínico protegido; ó mediante reacción de un ácido amínico respecto de un péptido con grupo carboxílico libre y grupo amínico protegido con un ácido amínico respecto un péptido con grupo amínico activado y grupo carboxílico protegido.
- 5.
10. 3ª.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque el nonadecapéptido L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutaminil-(ó glutamil)-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolina se condensa con el dipéptido L-valil-L-lisina.
- 15.
20. 4ª.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque el heneicosapéptido se obtiene por condensación en etapas de los distintos ácidos mίνicos desde el extremo carboxílico, empezando con el derivado dipeptídico éster L-valil-L-lisínico con grupo ξ -amínico protegido.
- 25.
30. 5ª.- Procedimiento, según los especificado en las reivindicaciones 1ª-3ª, caracterizado porque los grupos amínicos libres se protegen por el resto butiloxicarbonílico.
- 6ª.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1ª, 2ª y 4ª, caracteriza-

272025



do porque como derivado dipeptídico se emplea el éster bencílico de la L-valil-parafenilazo-benciloxycarbonil-lisina.

5. 7ª.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1ª, 2ª, 4ª y 6ª, caracterizado porque la condensación por etapa se efectúa según el método de los anhídridos mixtos.

10. 8ª.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1ª, 2ª, 4ª, 6ª y 7ª, caracterizado porque el grupo α -amínico del ácido amínico a proteger se protege por el resto butilo-terciario-oxicarbonílico, los grupos ω -amínicos de la lisina y arginina por el grupo carbobenzoxi, los grupos hidroxílicos de la serina y de la tirosina por el grupo bencílico y en caso dado el grupo γ -carboxílico del ácido glutamínico por el grupo éster butílico terciario.

15. 9ª.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones 1ª-3ª, caracterizado porque la butilo terciario-oxicarbonil-L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutaminil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-glicil-N^ε-butilo terciario-oxicarbonil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-N^ε-butilo terciario-oxicarbonil-L-lisil-N^ε-butilo terciario-oxicarbonil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolina se condensa con un éster metílico de la L-valil-N^ε-butilo terciario oxicarbonil-L-lisina y se liberan los grupos amínicos.

20. 10ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 9ª, caracterizado porque la

25.

30.

272025



condensación se efectúa en presencia de dióxido
carbónico.

5. 11ª.- "Procedimiento para la obtención
de polipéptidos nuevos": tal y como queda subs-
tancialmente descrito en la presente memoria.

Esta Memoria consta de treinta y tres
hojas escritas a máquina por una sola cara.

15 NOV. 1961

Madrid,

CIPA SOCIETE ANONYME.

2, rue de la Harpe, 106 DEI