



286566

P A T E N T E  
D E  
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE SER<sup>4</sup>-ILE<sup>8</sup>-  
OXITOCINA (S,S'-DEHIDRO-L-CISTEINIL-L-TIROSIL-L-ISOLEUCIL-  
L-SERIL-L-ASPARAGINIL-L-CISTEINIL-L-PROLIL-L-ISOLEUCIL-GLI-  
CINAMIDA)", a favor de la firma suiza J.R. GIGY A.G., resi-  
dente en BASILEA (Suiza).

= . =

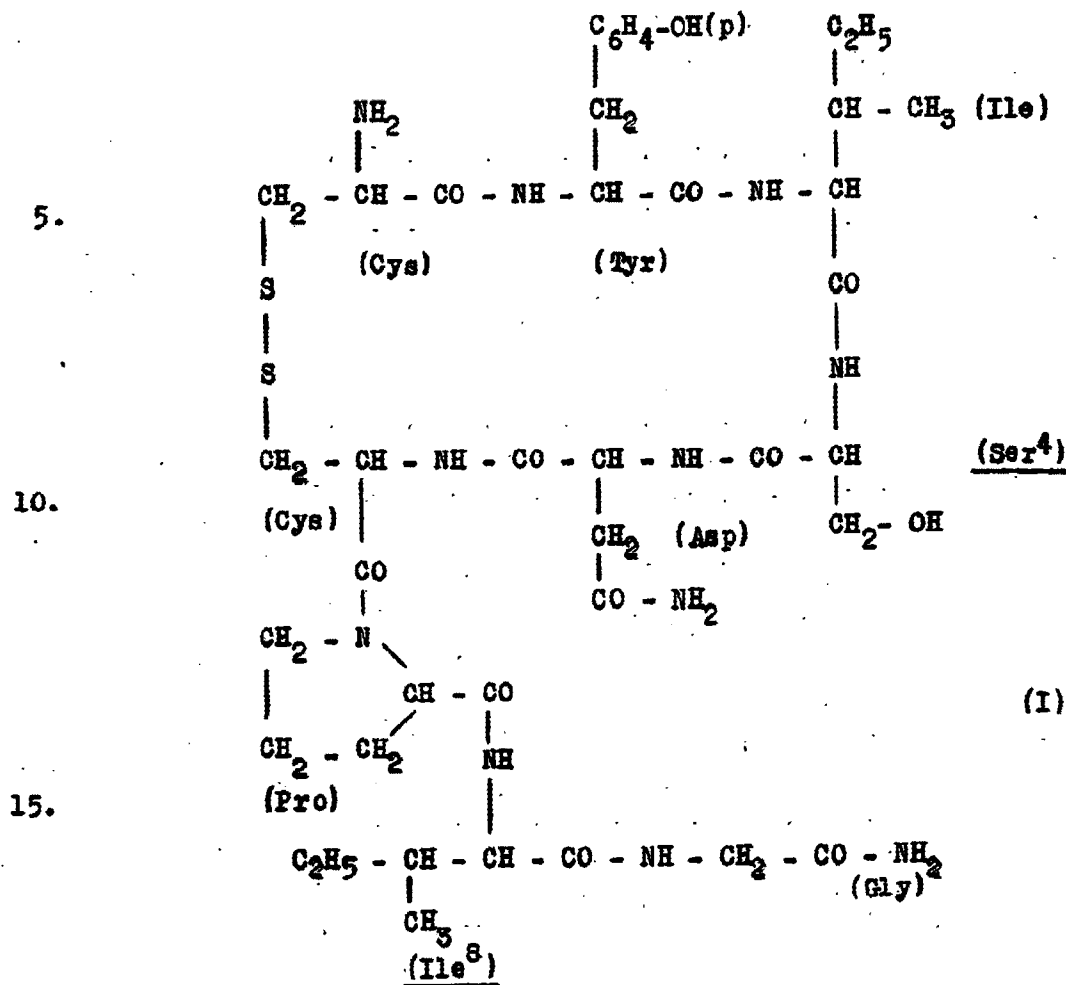
MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a la preparación  
de una nueva nonapeptidamida cíclica, a saber, la Ser<sup>4</sup>-  
-Ile<sup>8</sup>-oxitocina (S,S'-dehidro-L-cisteinil-L-tirosil-L-  
-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-L-cisteinil-L-prolil-L-  
5. isoleucil-glicinamida).

Esta nonapeptidamida, se distingue de la oxitoci-  
na conocida por la presencia en posición cuarta del radical  
L-serina en lugar del radical L-glutamina, y la presencia en  
posición octava del radical L-isoleucina en lugar del radical  
10. L-leucina. Por consiguiente, posee la siguiente fórmula I



286566



20. La nonapeptidamina cíclica de la fórmula anterior, muestra una actividad oxi-tócica similar a la de la oxitocina. En cambio le falta ampliamente la eficacia a la presión arterial de la oxitocina, por lo cual su utilización en las diferentes indicaciones de la última presenta especial interés.

25. Mientras que para la oxitocina, la proporción de la actividad oxi-tócica en úteros de ratas aisladas as-  
 30. oiende a un 90:1 para el efecto de elevación de presión arterial en la rata, para la Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>-oxitocina prepa-

286566



- rada de acuerdo con la invención, está situada a unos 2000:1 (determinación de la acción oxitócica en los úteros de ratas aisladas según P. Holton, Brit. J. Pharmacol. 3, 328 (1948) y de la actividad presora en las ratas según J. Dekanski, Brit. J. Pharmacol. 7, 567 (1952), con lo cual las actividades se indican en unidades internacionales; 1 IE corresponde a la acción de 0,5 mg de las Standard 3 internacionales, suministrado por el National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londres y extracto del lóbulo posterior de la hipófisis.

5. Para la preparación de la nueva nonapeptidamida cíclica, se condensa un aminoácido N-bloqueado o bien S,N-bloqueado, basado en esta, o un derivado funcional apto para reaccionar de uno de tales aminoácidos con un derivado, referente al grupo carboxilo, del aminoácido, eventualmente S-bloqueado, contiguo del lado carboxilo en la materia final, o se pone en libertad el grupo amino en el derivado dipéptido N-bloqueado o bien S,N-bloqueado obtenido, y se condensa con el aminoácido N-bloqueado o bien S,N-bloqueado, del lado del amino, o un derivado funcional del mismo capaz de reaccionar, o el derivado dipéptido N-bloqueado o bien S,N-bloqueado obtenido tras transformación en el dipéptido N-bloqueado o bien S,N-bloqueado o un derivado funcional del mismo, capaz de reaccionar se condensa con un derivado, referente al grupo carboxilo, del aminoácido, eventualmente S-bloqueado, del lado carboxilo, y la condensación del lado amino y/o del lado carboxilo se repite con los derivados de aminoácido correspondientes, bajo utilización de glicinamida o for-
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

286566



5. mación posterior del grupo glicinamida, hasta la síntesis de la nonapeptidamida S,N,S'-bloqueada, y en esta se pone en libertad el grupo amino y los grupos mercapto, y la L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida obtenida se oxida para llegar al compuesto S,S'-dehidro, de la fórmula I anterior.

10. Con la repetición de las condensaciones se comprende en lo precedente tanto la unión subsiguiente de distintos radicales de aminoácido en el derivado tripéptido eventualmente N-bloqueado o bien S,N-bloqueado, como también los aminoácidos análogos mutuamente vecinos, pero de unión separada cada dos derivados de otros en la materia final, para llegar a derivados dipéptidos.

15. la combinación de dos o eventualmente tres de tales derivados dipéptidos entre sí, o de uno o dos con el derivado tripéptido antes citado o con derivados de aminoácido distintos para llegar a derivados polipéptidos, por ejemplo, un derivado tetrapéptido y un

20. derivado pentapéptido, y su condensación para llegar a la nonapeptidamida S,N,S'-bloqueada arriba citada.

25. Como grupos bloqueadores para los grupos amino pueden entrar en consideración radicales desdoblables por hidrólisis ácida o alcalina, como el radical carbonotercibutoxi y el radical de tritilo (radical de trifenilmetilo) o bien el radical de trifluoacetilo, radicales desdoblables como radicales carbalcooxi inferiores, el radical carbobencilo o bien nuevamente el radical carbonotercibutoxi por solvólisis catalizada ácida, por

30. ejemplo tratamiento con ácido bromhídrico en ácido

286566



- acético glacial o tratamiento con ácido trifluoacético; radicales desdoblables, como el radical tosilo (radical p-toluolsulfonilo) o el radical carbobenciloxi, por reducción, por ejemplo tratamiento con un metal alcalino en amoníaco; o en componentes exentos de cisteína, radicales desdoblables, como nuevamente el radical carbobenciloxi, por hidrogenación. Como grupo bloqueador del grupo mercapto pueden entrar en consideración, en especial, el radical de bencilo reductivo, eliminable, por ejemplo mediante sodio y amoníaco fluido, y además, por ejemplo el radical de tritilo desdobleable mediante sodio y amoníaco fluido, ácido bromhídrico en ácido acético glacial, ácido trifluoacético hirviendo o más ventajosamente mediante una sal de plata o mercurio y piridina en un alcohol inferior.
- 5.
- 10.
- 15.

- Ácidos aminocarboxílicos o péptidos N-bloqueados o bien S,N-bloqueados se condensan, por ejemplo con derivados aminoácidos o derivados péptidos con grupos amino libres y enlazados, por ejemplo a grupos carboxilo esterificados mediante una carbodiimida, por ejemplo mediante N,N'-diciclohexilcarbodiimida en dimetilformamida y/o acetonitrilo. Como derivados funcionales capaces de reaccionar de aminoácidos y en especial de péptidos con grupos amino bloqueados son adecuadas por ejemplo las acidas, que son fácilmente accesibles, por ejemplo mediante reacción de los ésteres correspondientes, por ejemplo metiléster, con hidrazina y tratamiento de las hidracidas con ácido nítrico.
- 20.
- 25.

- Además, pueden entrar especialmente en consideración como derivados de distintos aminoácidos N-bloqueados,
- 30.

286566



- asimismo los ésteres capaces de reacción, como por ejemplo p-nitro-feniléster, y anhídridos mezclados con ácidos alooxifórmicos inferiores, que por ejemplo, están situados en los ácidos libres mediante acción de alquilésteres clorofórmicos.
5. Estos derivados funcionales capaces de reacción de aminoácidos o péptidos N-bloqueados como derivados referentes a los grupos carboxilo de péptidos se hacen reaccionar por ejemplo con alquilésteres péptidos inferiores o alquilésteres de aminoácidos inferiores, con
10. sales de péptidos o aminoácidos o con hidrazidas N<sup>2</sup>-bloqueadas, por ejemplo 2-carbotercibutoxihidracidas, de péptidos o aminoácidos, cuyo grupo de hidracida bloqueado se deja transformar por su parte tras la reacción, por ejemplo por solvólisis catalizada ácida mediante ácido trifluoacético o mediante ácido clorhídrico alcandílico en el grupo de hidracida libre.
- 15.

- Una derivación de la reacción de acuerdo con la invención consiste por ejemplo en que, se transforma por una parte, para la preparación del derivado pentapéptido
20. C-terminal, un N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cistein-alquiléster o -aralquiléster, por ejemplo el metiléster conocido, mediante tratamiento con hidracina en la N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cistein-hidracida y por último mediante ácido nítrico se transforma en la
25. dipeptidacida correspondiente S,N-bloqueada, ésta se hace reaccionar con la L-prolil-L-isoleucil-glicinamida conocida, o se condensa la N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteina conocida con la tripeptidamida citada mediante una carbodimida, por ejemplo N,N'-diciclohexilcarbodimida,
30. y la N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-

286566



- prolil-L-isoleucil-glicinamida obtenida en ambos casos se transforma mediante tratamiento con ácido bromhídrico en ácido acético glacial o con ácido trifluoacético caliente en la L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida, y por otra parte para la preparación del derivado tetrapeptido N-terminal se hace reaccionar un derivado funcional capaz de reaccionar de la N-carbobenciloxi-L-isoleucina, por ejemplo el anhídrido mezclado con un ácido alcoxifórmico inferior o el N-carbobenciloxi-L-isoleucil-p-nitrofeniléster, con un L-serin-alkiléster o -aralkiléster, por ejemplo el L-serin-metiléster, para llegar a un N-carbobenciloxi-L-isoleucil-L-serin-éster, por ejemplo al metiléster, o con una serin-hidracida N<sup>2</sup>-bloqueada, como por ejemplo la L-serin-N<sup>2</sup>-carbatercibutoxi-hidracida, para llegar al derivado N<sup>2</sup> correspondiente de N-carbobenciloxi-L-isoleucil-L-serin-hidracida, este o los ésteres anteriormente citados se tratan con hidrógeno activado catalíticamente, los L-isoleucil-L-serin-ésteres originados, por ejemplo el metiléster, o bien el derivado N<sup>2</sup> originado de la L-isoleucil-L-serin-hidracida se condensan con S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosina conocida mediante una carbodiimida, por ejemplo N,N'-diciclohexilcarbodiimida, para llegar a un S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-serin-éster por ejemplo al metiléster o bien al derivado N<sup>2</sup> correspondiente de tetrapeptidhidracida S,N-bloqueada, los primeros por tratamiento con hidrazina o bien el último por solvolisis catalítica ácida se transforman en la S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-serin-hidracida, ésta mediante acción de ácido nitroso se transforma en la S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



286566

- L-serin-ácida, esta tetrapeptídica N-terminal, S,N-bloqueada se hace reaccionar con la pentapeptídica C-terminal, S-bloqueada obtenida anteriormente para llegar a la S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida, en esta se desdoblan los dos radicales S-bencilo y el radical S-tosilo, por ejemplo por tratamiento con un metal alcalino en amoníaco, y la L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida originada se transforma por oxidación, por ejemplo mediante oxígeno o ferrocianuro potásico en el compuesto S,S'-dehidro, la Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>-oxitocina.
- Los ejemplos siguientes aclaran la preparación de la Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>-oxitocina de acuerdo con la invención, sin embargo no representan una única forma operatoria posible.
- Todas las temperaturas se indican en grados Celsius y los puntos de fusión se hallan corregidos. Los giros específicos se determinaron en un tubo de 10 cm de longitud con ayuda del polarímetro según Lippich de la firma Schmidt y Haensch.
- El cromatograma en capa delgada utilizado para la prueba de la homogeneidad de los productos de reacción se realizó según E. Stahl, "Chemiker-Zeitung 82, 323 (1958)", véase asimismo M. Brenner y A. Niederwieser, *Experientia* 16, 378 (1960), sobre gel de sílice G "Merck". Los sistemas disolventes se prepararon por mezclas de los componentes en las proporciones de volumen indicadas.
- Como métodos de prueba para los productos de reacción se utilizaron

286566



- a) el método de ninhidrina: en forma usual
- b) el método de cloro: según H.N. Rydon y P.W.G. Smith, Nature (Londres) 169, 922 (1952), modificado según F. Reindel y W.Hoppe Chem. Ber. 87, 1103 (1954)
- c) el método de Folin: según O.Folin y V. Ciocalteu, J. biol. Chem. 73, 629 (1927)

10. EJEMPLO 1

a) metiléster de N-carbobenciloxi-L-isoleucil-L-serina:

- 32,4 g (0,122 moles) de N-carbobenciloxi-L-isoleucina (preparada por ejemplo según P.-A. Jaquenoud y R. A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta 44, 113 (1961)) se tratan con 17,2 cc (0,124 moles) de trietilamina, disueltos en 320 cc de tetrahidrofurano y se refrigera a -10°. A esta solución se adicionan gota a gota a -10°, 12,1 cc (0,126 moles) de etiléster del ácido clorofórmico. Después de 15 minutos, se adiciona en el término de 5 minutos una solución enfriada a -5° de 18,67 g (0,12 moles) de clorhidrato de metiléster de L-serina (preparado por ejemplo según St. Guttman y R.A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta 41, 1852 (1958)) y 16,9 cc (0,122 moles de trietilamina en cloroformo absoluto. Tras cuatro horas de agitación a 0°, se concentra la mezcla de reacción en vacío hasta desecado y el residuo se fija en 1200 cc de acetato de etilo y 200 cc de agua. La solución de acetato de etilo se lava, cuidadosamente con

286566



5. agua, luego con ácido clorhídrico 1-n, con agua, con bicarbonato sódico al 5% y otra vez con agua y se seca sobre sulfato sódico. Tras el concentrado de la solución y adición de éter de petróleo, se separa por cristalización el éster dipeptido bruto; punto de fusión 179-180°.

10. Para la purificación, el producto cristaliza dos veces en éster acético-éter de petróleo; punto de fusión 180,5-181,5°;  $[\alpha]_D^{24} + 3,9^\circ$  (c = 5 en dimetilformamida). El producto es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en el sistema benceno/acetona 7:3; prueba: método de cloro.

b) Clohidrato de metiléster de L-isoleucil-L-serina:

15. 26,0 g (71 mM) de metiléster de N-carbobenciloxi-L-isoleucil-L-serina se disuelven en 380 cc de metanol y 6,25 cc de ácido clorhídrico concentrado y se hidrogenan en corriente de hidrógeno en presencia de 5 g de carbonopaladio (10% de paladio) hasta que no se desarrolla más anhídrido carbonico. Tras alejamiento del catalizador, se concentra la solución de reacción en vacío hasta desecado y el residuo cristaliza dos veces en metanol/éter y una vez en metanol/acetona/éter. Punto de descomposición: 203-204°.  $[\alpha]_D^{24} + 12,6^\circ$  (c=3,01 en metanol).

20.

25.

El producto es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en los sistemas: n-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1, metiletilcetona/piridina/agua 65:5:20. Prueba: método de cloroformo, método ninhidrina.

30.

286566



o) Metiléster de S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-  
-isoleucil-L-serina:

5. 3,55 g (13,2 mM) de clorhidrato de metiléster de L-isoleucil-L-serina, se disuelven a temperatura ambiente en 30 cc de dimetilformamida, se enfrían a 0°, se tratan con 1,85 cc (13,2 mM) de trietilamina y se dejan durante diez minutos agitando frecuentemente. A continuación se filtra el clorhidrato de trietilamina precipitado y se lava con 5 cc de dimetilformamida. La solución del éster dipéptido libre, se trata con una solución de 6,98 g (13,2 mM) de S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosina, (preparada según V. Du Vigneaud, M.F. Bartlett y A. Johl, J. Am. Chem. Soc. 79, 5572 (1957)) en 35 cc de acetonitrilo.
10. La solución de reacción limpia, se enfría a -10°. Tras adición de 2,72 g (13,2 mM) de N,N'-diciclohexil-carbodiimida, se inicia tras un tiempo muy corto la precipitación de N,N'-diciclohexil-urea y del éster tetrapéptido. Después de 55 horas de agitación a -10°, se filtran los productos precipitados, y se lavan con dimetilformamida/acetonitrilo algo frío (1:1) y con acetonitrilo. Para la eliminación de la N,N'-diciclohexil-urea se fija el producto bruto en 80 cc de dimetilformamida y se mantiene durante dos horas a 0°. La urea se filtra, y el producto de reacción de lo filtrado precipita mediante adición de 700 cc de acetato de etilo caliente. El éster tetrapéptido S,N-bloqueado, tras tres cristalizaciones en metanol, es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en los sistemas benceno/acetona 1:1;
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

286566



cloroformo/etanol/amoníaco al 17% 2:2:1, n-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1. Prueba: método de cloro y método de Folin. Punto de fusión 219-221; derrite a 210°,  $\alpha_D^{25}$ , -59,5° (c = 0,99 en ácido fórmico,

5.  $\alpha_D^{23}$ , -16,2° (c = 0,98 en piridina).

d) Hidracida de S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-serina:

10. 5,57 g (7,5 mM) de metiléster de S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-serina se disuelven en 154 cc de dimetilformamida.

15. La solución se enfría a 0°, se trata con 4,5 cc (92,2 mM) de hidrato de hidracina y se deja durante 45 horas a 0°. (La solución de reacción se trata luego bajo buena refrigeración con 400 cc de agua helada. El producto de reacción precipita con ello como gelatina. Tras dos horas de permanencia en la nevera, se filtra la hidracida bruta, se lava bien con agua y se seca en vacío sobre anhídrido fosfórico. El producto bruto

20. purifica mediante dos cristalizaciones en dimetilformamida/acetonitrilo. El producto obtenido derrite a 222° y funde, bajo descomposición a 226-229°  $\alpha_D^{24}$ , -69,2° (c = 1,79 en ácido fórmico),  $\alpha_D^{23}$ , + 7,2° (c = 1,99 en dimetilformamida).

25. El producto es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en los sistemas: n-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1, metiletilcetona/piridina/agua 65:5:20, prueba: método de cloro y método de Folin.

286566



e) Ácida tetrapéptida N-terminal: ácida de S-bencil-N-to-  
sil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-serina:

5. 0,966 g (1,3 mM) de hidracida de S-bencil-N-tozil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-serina, se disuelven en 35 cc de dimetilformamida y 3,9 cc de ácido clorhídrico 1-n, se enfría a  $-10^{\circ}$  y se trata lentamente con 0,29 cc de nitrito sódico 5-n. Se agita durante 10 minutos y luego precipita la ácida a una temperatura de  $-8^{\circ}$  a  $-5^{\circ}$  con 45 cc de agua helada. El producto gelatinoso se separa por succión, se lava con agua fría, luego con bicarbonato sódico al 3% y de nuevo con agua fría y se seca al alto vacío, a  $0^{\circ}$  durante 4 horas.
10. Punto de fusión  $244-246^{\circ}$  (descomposición, espectro por rayos infrarrojos: bandas marcadas a  $\lambda = 4,75$  micras ( $-\text{CO}_2$ )).
- 15.

f) Hidracida de N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-  
-L-cisteina:

20. 14,2 g (30 mM) de metiléster de N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteina (preparada, por ejemplo según M. Bodanszky y V. Du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc. 81, 5688 (1959)), se disuelven en 250 cc de dimetilformamida, se enfrían a  $0^{\circ}$  y se tratan con 7,3 (150 mM) de hidrato de hidracina.
- 25.

30. La solución de reacción se mantiene durante 55 horas a  $0^{\circ}$ . Para aislar la hidracida, se trata la solución con 1800 cc de etanol, con lo que precipita esta como producto bruto con el punto de fusión  $213-215^{\circ}$  (descom-

286566



posición). Tras dos cristalizaciones en dimetilformamida/acetoneitrilo se eleva el punto de fusión a 214,5-215,5° (decomposición),  $[\alpha]_D^{25}$ , -33,9° (c = 2,01 en ácido fórmico),  $[\alpha]_D^{25}$ , -29,7° (c = 0,52 en dimetilformamida).

5.

El producto es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en el sistema n-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1; prueba: método de cloro.

10.

g) Acida de N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteina:

A una solución de 7,103 g (15 mM) de hidracida de N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteina, en 135 cc de dimetilformamida y 45 cc de ácido clorhídrico 1-n, se adicionan en forma de gotas, a -10° y bajo agitación, 3,6 cc (18 mM) de un nitrito sódico 5-n previamente enfriado. La acida precipita después de unos dos minutos en forma cristalina. Después de 15 minutos de agitación a -10°, se trata con precaución con 80 cc de agua para la total precipitación de la acida. Lo precipitado se filtra, se lava primero con agua fría, luego con bicarbonato sódico al 2% frío y de nuevo con agua y se seca al alto vacío, durante 26 horas a 0°.

15.

20.

25.

Punto de fusión 124° (decomposición), controles en el espectro por rayos infrarrojos bandas limpias a  $\lambda = 4,75$  micras (-CO.N<sub>3</sub>); el mismo todavía libre de isocianato ( $\lambda = 4,5$  micras) tras diez días de permanencia a temperatura ambiente.

30.

286566



h) Clorhidrato de etiléster de L-isoleucil-glicina:

5. 15,3 g (44 mM) de etiléster de N-carbobenciloxi-L-isoleucil-glicina, (preparado según P.-A. Jaquenoud y R.A. Boissonnas, Helv. 44, 113 (1961)), disueltos en 200 cc de ácido acético glacial, se tratan a temperatura ambiente, durante siete horas y media con hidrógeno en presencia de 1,1 equivalentes de ácido clorhídrico concentrado y 5 g de carbono - paladio (10% de paladio).
10. La solución de reacción se libera de las partes fácilmente flúidas; el aceite que permanece, cristaliza tras varias trituraciones con éter seco. El producto de reacción funde, tras dos recristalizaciones en etanol/éter 1:5, a 136-137°,  $[\alpha]_D^{24} + 13,9^\circ$  (c = 3,0 en etanol absoluto).
- 15.

Es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en el sistema: n-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1, prueba: método de ninhidrina.

20. i) etiléster de N-carbobenciloxi-L-prolil-L-isoleucil-glicina:

25. 12,15 g (48 mM) de clorhidrato de etiléster de L-isoleucil-glicina se disuelven en 120 cc de cloroformo absoluto, se enfrían a 0°, y se tratan a 0° con 7,4 cc (52,8 mM) de trietilamina y una solución de 22,2 g (60 mM) de N-carbobenciloxi-L-prolin-p-nitrofeniléster (preparado según M. Bodanszky y V. Du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc. 81, 5688 (1959)) en 40 cc de cloroformo absoluto.
30. La solución de reacción amarilla se agita du-



286566

- rente veinte horas a temperatura ambiente. Para la preparación se diluye con 400 cc de cloroformo, se extrae tres veces con 90 cc cada vez de ácido clorhídrico l-n, 4 veces con 90 cc cada vez de amoníaco l-n y tres veces con 90 cc cada vez de agua y se seca sobre sulfato sódico. El disolvente se elimina en vacío y el residuo cristalino recristaliza dos veces en acetato de etilo, punto de fusión 159-160°,  $[\alpha]_D^{24}$ , -86,4° (c = 1,99 en metanol).
- 5.
10. El producto es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en los sistemas benceno/acetona 7:3 y n-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1. Prueba: método de cloro.
15. 1) N-carbobenciloxi-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida:
- Se disuelven 15,5 g (35,7 mM) de éster de N-carbobenciloxi-L-prolil-L-isoleucil-glicina en 400 cc de metanol y se hace pasar a 0° un gas de amoníaco seco hasta la saturación. Después de treinta horas de permanencia a temperatura ambiente, la solución de reacción se concentra en vacío y a 30° hasta secado y el residuo cristalino cristaliza en metanol/agua 1:3. El producto funde a 183-184,5°,  $[\alpha]_D^{24}$ , - 65,7° (c = 1,90 en metanol).
- 20.
25. Es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en los sistemas: benceno/acetona 3:7 y n-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1
- 30.



Prueba: método de cloro.

286563

k) L-prolil-L-isoleucil-glicinamida:

5. 9,35 g (22,3 mm) de N-carbobenciloxi-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida se disuelven en 200 cc de metanol y se mezclan con 1,1 equivalentes de ácido clorhídrico acuoso y se tratan durante 5 horas con hidrógeno en presencia de carbono y paladio (10% de paladio). El catalizador se filtra y la solución de reacción se concentra a 35° en vacío.
10. El residuo espumoso e incoloro cristaliza una vez en metanol-cloroformo y dos veces en metanol/acetato de etilo. El clorhidrato de la tripeptidamida así originado, funde, tras derretido a 214°, a 215,5-218° bajo descomposición,
15.  $[\alpha]_D^{24}$ , -42,4° (c = 2,1 en etanol al 95%).

- Para la puesta en libertad de la base, se disuelve el clorhidrato anterior en 50 cc de metanol y la solución se filtra mediante una columna intercambiadora de iones, de 100 g de Dowex-21K (forma OH), previamente tratada con metanol. La columna se lava luego con 400 cc en total de metanol y el eluato libre de cloro se concentra en vacío a 30° hasta el secado. La tripeptidamida permanece como copos de agujas de punto de fusión 171,5-173°,  $[\alpha]_D^{24}$ ; - 65,5° (c = 2,02 en ácido acético glacial).
- 20.

25. Es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en los sistemas: n-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1, metiletilcetona/piridina/agua 65:5:20, Prueba: método de ninhidrina.

30. La tripeptidamida anterior ya se preparó por P.-A. Jaquenoud y R.A. Boissonnas, Helv. Chim. Acta 44,

286566



113 (1961), según una sucesión reaccional similar, que difiere de la síntesis indicada anteriormente, mediante desdoblamiento de los grupos carbobenciloxi por medio de ácido bromhídrico en ácido acético glacial, y la utiliza-

5.

ción del anhídrido de ácido N-carbobenciloxi-prolin-etoxi-fórmico en lugar de N-carbobenciloxi-prolin-p-nitro-fenil-éster, con los que la tripeptidamida obtenida muestra el punto de fusión 118° y el giro específico  $[\alpha]_D^{21}$ , - 63° ± 1° (c = 2 en ácido acético glacial).

10.

l) N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida

15.

La acida de N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteina preparada según g), se disuelve en 150 cc de dimetilformamida fría y se cede a una solución de 4,264 g (15 mM) de L-prolil-L-isoleucil-glicinamida (véase k)) y 2,1 cc (15 mM) de trietilamina en 50 cc de dimetilformamida. La solución de reacción se agita durante 56 horas, desde 0 a +3°. Después de este tiempo no son reconocibles las bandas de acida a 4,75 micras en el espectro por rayos infrarrojos.

20.

25.

Para aislar el producto de reacción se enfría la solución reaccional a -10° y el producto de reacción precipita como masa gelatinosa por adición cuidadosa de 750 cc de agua helada. El precipitado se separa por succión, se lava bien con agua fría y se seca en vacío sobre anhídrido fosfórico. Para eliminar las impurezas se tritura intimamente y filtra el producto bruto finamente pulverizado, tres veces con

30.

286566



40 cc cada vez de acetonitrilo/metanol 4:1. Después de dos cristalizaciones en dimetilformamida/acetonitrilo 1:4, se obtiene la pentapeptidamida S,N-bloqueada con el punto de fusión 233-235° (descomposición),  $[\alpha]_D^{23}$ , -51,3° (c = 1,03 en dimetilformamida),  $[\alpha]_D^{25}$ , -79,3° (c = 1,03 en ácido acético glacial).

5.

El producto es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en los sistemas: n-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1, metiletilcetona/piridina/agua 65:5:20, metanol/cloroformo 2:1. Prueba: método de cloro.

10.

La misma pentapeptidamida bloqueada puede obtenerse asimismo mediante condensación de N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína (preparada, por ejemplo según R.A. Boissonnas, St. Guttman, P.-A. Jaquanoud y J.-P. Waller, Hel. 38, 1491 (1955)) con L-propil-L-isoleucil-glicinamida en dimetilformamida/acetonitrilo (1:4,4) con ayuda de N,N'-diciclohexil-carbodiimida.

15.

20.

m) Pentapeptidamida C-terminal: L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida

2,01 g (2,78 mm) de N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida se tratan con 12 cc de ácido bromhídrico 2-n en ácido acético glacial. El compuesto carbobenciloxi se disuelve totalmente después de 40 minutos. Tras 2 1/2 horas de agitación a 20° se cede a la solución amarillo oscura de 35 cc de éter absoluto, con lo que precipita el bromhidrato de pentapeptidamida S-bloqueada como masa resinosa. El precipitado es granulado tras trituración repetida con éter absoluto.

25.

30.

286566



Se filtra y disuelve y precipita dos veces en etanol/éter.

El mismo bromhidrato se obtiene al utilizar ácido bromhídrico en ácido trifluoroacético, mientras que se obtiene el trifluoroacetato correspondiente al utilizar solamente el ácido trifluoroacético a temperaturas a reflujo.

5.

Para la puesta en libertad de la pentapeptidamida S-bloqueada se disuelven 2,46 g (3,66 milimoles) de bromhidrato de L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida en 30 cc de metanol y se filtra mediante una columna intercambiadora de iones de 60 g Dowex-21K (forma OH) tratada previamente con metanol. La pentapeptidamida libre se eluye con 250 cc de metanol y el eluato exento de bromo se concentra a 30° en vacío, bajo exclusión de fluido para el secado. El residuo se disuelve y precipita una vez en etanol/éter absolutos y una vez en acetona/etilacetona/éter. Se obtiene la pentapeptidamida S-bloqueada como polvo higroscópico, incoloro, que se utiliza directamente al copular con la tetrapeptidacida S,N-bloqueada, obtenida de acuerdo con e).

10.

15.

20.

25.

n) S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida.

La tetrapeptidacida S,N-bloqueada, preparada bajo e) se disuelve en 35 cc de dimetilformamida enfriada a -10°, se trata con una solución enfriada a -10° de 0,769 g (1,3 milimoles) de L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-

30.

286566



5. -propil-L-isoleucil-glicinamida (preparada según M) y 0,18 cc (1,3 milimoles) de trietilamina en 5 cc de dimetilformamida. Se eleva la temperatura de -7 a -5° C y la solución de reacción se agita durante 22 horas a esta temperatura.
- Después de este tiempo faltan en el espectro de rayos infrarrojos las bandas acida características a 4,75 milimicras.
10. La nonapeptidamina N, S, S'-bloqueada precipita por adición cuidadosa de 130 cc de agua helada, se filtra, se lava con agua fría, ácido clorhídrico 0,5-n, agua, bicarbonato sódico al 3% y agua y se seca sobre anhídrido fosfórico en vacío. El producto sinteriza a 15. 205° y funde a 211-217°. Para la purificación se disuelve y precipita cuatro veces en dimetilformamida/acetonitrilo 1:6 y se lava cada vez con dimetilformamida/acetonitrilo 1:7, metanol/acetonitrilo 1:5, acetonitrilo, acetato de etilo y éter. Punto de fusión tras endurecido a 20. 211°: 225,5-228,5° (descomposición)  $\frac{\alpha}{D}^{24}$  - 22,7° (c = 1,44 en dimetilformamida).
25. 0) S, S'-dehidro-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-L-cisteinil-L-propil-L-isoleucil-glicinamida =Ser<sup>4</sup> -Ile<sup>8</sup>-oxitocina.
30. 100 mg (0,767 milimoles) de N-tosil-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida se disuelven en 150 cc de amoníaco fluido (destilado bajo sodio)

280500



- y la solución se trata con sodio hasta que el color azul permanece durante 5 minutos. El sodio excedente se destruye con cloruro amónico, el amoniaco se volatiliza y el residuo se libera, en un desecador al vacío sobre ácido sulfúrico concentrado, del amoniaco restante. El residuo se disuelve en 200 cc de agua helada, la solución se lleva con ácido acético 2-n a un pH de 6,6 a 6,8 y se hace pasar una corriente de aire hasta que la reacción precipita negativamente con nitroprusiato sódico. La solución de reacción se mantiene luego a un pH de 4 con ácido acético 2-n, se filtra por un hyflo y se liofiliza. El producto bruto se purifica por separación a contracorriente según Craig [L.C. Craig, *Analytic. Chemistry*, 22, 1346 (1950)] en el sistema butanol secundario/ácido acético 0,017-n. La reacción principal posee con un coeficiente de distribución K de 0,53 a 25° en úteros de ratas aislados una actividad oxitocica de aproximadamente 130 I.E./mg.
20. E J E M P L O 2
- a) 1-(N-carbobenciloxi-L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidracina.
25. 3,59 g (15 milimoles) de N-carbobenciloxi-L-serina [por ejemplo preparada según recetas de St. Guttman y R.A. Boissonas, *Helv.* 41, 1852 (1958) o F. Baer y J. Maurukas, *J. biol. chem.* 212, 25 (1955)] y 2,18 g (16,5 milimoles) de t-butoxicarbonil-hidracina [obtenida por ejemplo según las indicaciones de L.A. Carpino. *J. Am.*
- 30.

286566



- Chem. Soc. 79, 98 y 4427 (1957) y L.A. Carpino, C.A. Ciza y B.A. Carpino, *ibid.* 81, 955 (1959) se disuelven en 35 cc de metanol y se tratan a 0° en el término de una hora con una solución de 6,99 g (16,5 milimoles) de
5. 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4)-etil)-carbodiimidometil-p-toluenosulfonato en 15 cc de metanol. Tras permanencia durante 20 horas a 0°, se destila el metanol en vacío y el aceite, que permanece, se fija en éster acético-
10. -agua. La solución de éster acético se lava con cuidado con agua, ácido cítrico 2-n, agua, bicarbonato sódico al 5% y agua y se seca sobre sulfato sódico. Tras eliminación del éster acético en vacío permanece el producto como aceite, que cristaliza al triturar con éter. El
15. producto bruto cristaliza en éster acético/hexano, punto de fusión 99-101° ó 112-113° (polimorfia; identidad de los espectros de rayos infrarrojos en solución, igual actividad óptica, igual proporción cromatográfica en capas delgadas.
20.  $[\alpha]_D^{25}$ , -25,9° (c = 2,11 en metanol)  
Rendimiento: 2,95 g (56%).

- El producto es uniforme en cromatograma de capas delgadas en los sistemas benceno/acetona 6:4, metiletilcetona/piridina/agua 65:5:20, N-butanol/ácido acético glacial/agua 3:1:1
25. Prueba: método de cloro:

- En lugar del metanol también se puede utilizar acetonitrilo como disolventes y se puede reemplazar la
- 30.

286533



1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4)-etil-carbodiimida por la N,N'-diciiclohexil-carbodiimida.

b) Bencensulfonato de 1-(L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidrazina.

5. 14,8 g (41,9 milimoles) de 1-(N-carbobenciloxi-L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidracina, se disuelven en 250 cc de metanol y se hidrogenan en presencia de Pd-carbono (10% de Pd) en corriente de hidrogeno. El catalizador se filtra y la solución de reacción se concentra en vacío. El aceite que permanece se extrae dos veces con éter absoluto y se seca en vacío. El producto que se ofrece como espuma resistente, se elabora directamente a continuación.
10. Para la caracterización, se transforma el producto bruto en el glicensulfonato cristalino de la forma siguiente: 2,8 g de ácido bencensulfónico se disuelven en 6 cc de metanol, se enfría a 0° y se ceden a una solución helada de 3 g (13,7 milimoles) de 1-(L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidracina en 6 cc de metanol. El bencensulfonato precipita como aceite tras adición de 150 cc de éter seco, que se llevan mediante raspado a la cristalización. El producto se filtra, se lava con metanol/éter y para la purificación cristaliza dos veces en etanol/éter.
15. Punto de fusión 151,5-153,5° (descomposición);
20.  $\left[ \frac{\alpha}{D} \right]_{25}^{25} + 14,4^{\circ}$  ( $c = 1,96$  en metanol). El producto forma solamente una mancha en el cromatograma de capas delgadas en los sistemas benceno/etanol/7:3, metanol/cloro-
- 25.

30.

286566



formo/ $\text{NH}_3$  al 17% 2:2:1 y n-butanol/piridina/ácido acético  
glacial/agua 90:60:18:72. Prueba: Método ninhidrina.

5.

c) 1-(N-carbobenciloxi-L-isoleucil-L-seril-)-2-(t-butoxi-  
carbonil)-hidracina.

Una solución de 2,7 g (12,35 milimoles) de 1-(L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidracina y 4,77 g (12,35 milimoles) de N-carbobenciloxi-L-isoleucin-p-nitrofenil éster, preparado por ejemplo según M. Bodanszky y V. Du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc. 81, 5688 (1959), se deslían durante 48 horas a 13-14° en 24 cc de éster acético. Después de unas 7 horas, inicia la precipitación del dipéptido bloqueado. Por último, se enfría la mezcla de reacción a 0°, el producto se filtra y se lava cuidadosamente con éster acético frío. Tras dos cristalizaciones en éster acético caliente, funde a 187-188° bajo descomposición.  $[\alpha]_D^{25}$ , -36° (c = 2,01 en metanol).

20.

Es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en el sistema benceno/etanol 7:3, prueba: método de cloro.

25.

d) 1-(L-isoleucil-L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidracina.

13,4 g (28,8 milimoles) de 1-(N-carbobenciloxi-L-isoleucil-L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidracina se hidrogenan en 300 cc de metanol en presencia de Pd-carbono (10% Pd). Tras eliminación del catalizador se eva-

30.

286566



para el metanol en vacío. El residuo oleoso se trata varias veces con éter y éter/éter de petróleo y el disolvente se destila cada vez. El residuo pulverulento resultante se tritura luego con éter acético y se filtra. El

5. producto es cristalizado dos veces en acetonitrilo para la purificación.

Punto de fusión 133-134° (descomposición a 134°).

10.  $\alpha_D^{26}$ , -36,1° (c = 1,99 en metanol). El producto es uniforme cromatográficamente en capas delgadas en el sistema benceno/etanol 8:2, prueba: método de ninhidrina.

15. e) 1-(S-bencil-S-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidracina.

20. Una solución enfriada a -10° de 2, 22g (4,2 milimoles) de S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosina (preparada según V. Du Vigneaud, M.F. Bartlett y A. Johl, J. Am. Chem. Soc. 79, 5572 (1957)) y 1,41 g (4,2 milimoles) de

25. 1-(L-isoleucil-L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidracina en 22 cc de dimetilformamida/acetonitrilo 1:1 se trata con 0,89 g (4,3 milimoles) de N,N'-díciclohexil-carbodiimida y se agita durante 52 horas a -10°. En el curso de la

- reacción precipita N,N'-díciclohexil-urea y la hidracida tetrapéptida bloqueada. La mezcla de reacción se trata con 70 cc de agua helada, el precipitado se filtra y se

30. lava cuidadosamente con agua, bicarbonato sódico al 3% y por último otra vez con agua. Para la eliminación de la N,N'-díciclohexil-urea se fija el producto bruto en 8,3 cc



286566

de dimetilformamida. Tras 2 horas de permanencia a 0° se filtra la urea, se lava con 1,5 cc de dimetilformamida, y lo filtrado se trata con 50 cc de acetonitrilo. Con ello precipita la hidracida tetrapéptida bloqueada como gelatina. Se separa por succión, se lava con acetonitrilo y éter fríos y cristaliza dos veces en dimetilformamida/acetonitrilo. Punto de fusión 227-229° (Descomposición).

5.

$[\alpha]_D^{26}$ , -30,2°, (c = 1,96 en piridina).

10.

El producto es uniforme en el cromatograma de capas delgadas, en los sistemas: metiletilcetona/piridina/agua 65:5:20, benceno/etanol 8:2, n-butanol/piridina/ácido acético glacial/agua 90:60:18:72. Prueba: métodos de color y de Folin.

15.

f) S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-serin-hidracida

20.

0,506 g (0,6 milimoles) de 1-(S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril)-2-(t-butoxicarbonil)-hidracina se disuelven en 10 cc de ácido trifluoacético al 90% frío y se mantiene a temperatura ambiente durante 1 1/4 horas. Luego se enfría la solución reaccional a 0° y el producto precipita con 65 cc de agua helada. Se filtra y se lava con agua, bicarbonato sódico al 3%, agua y por último con acetonitrilo. Tras cristalización en dimetilformamida/acetonitrilo o dimetilformamida/metanol, esta hidracida tetrapéptida muestra iguales propiedades (punto de fusión, proporción cromatográfica en capas delgadas y actividad óptica) que la hidracida preparada por

25.

30.



hidracinólisis del S-bencil-N-tosil-L-cisteína ~~200500~~-N-bencil-

L-isoleucil-L-serin-metiléster, (véase ejemplo 1d) punto de

fusión 124-128°, descomposición a 230-231°.  $[\alpha]_D^{26} = - 69,3^\circ$

(c = 2,06 en ácido fórmico).  $[\alpha]_D^{26} + 6,3$  (c = 2,11 en

5. dimetilformamida).



286566

N O T A

Hecha la descripción del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención, las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la demanda de patente suiza núm. 3863/62, depositada el 30 de Marzo de 1.962, y núm. 12010/62 del 12 de Octubre de 1.962, existiendo en ambas unidad de invención.

5.

1. Procedimiento para la preparación de Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>6</sup>-oxitocina (S,S'-dehidro-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida), caracterizado porque se condensa un aminoácido

10.

N-bloqueado o bien S,N-bloqueado, que se basa en este, o un derivado funcional de uno de estos, capaz de reaccionar con un derivado, referente al grupo carboxilo, del aminoácido, eventualmente S-bloqueado, contiguo del lado carboxilo

15.

en la materia final, o se pone en libertad el grupo amino en el derivado dipéptido N-bloqueado o bien S,N-bloqueado obtenido, y se condensa con el aminoácido N-bloqueado

20.

o bien S,N-bloqueado, del lado del amino, o un derivado funcional del mismo capaz de reaccionar, o el derivado dipéptido N-bloqueado o bien S,N-bloqueado obtenido tras transformación en el dipéptido N-bloqueado o bien S,N-bloqueado o un derivado funcional del mismo, capaz de reaccionar se condensa con un derivado, referente al grupo carboxilo, del

286566



aminoácido, eventualmente S-bloqueado, del lado carboxilo, y la condensación del lado amino y/o del lado carboxilo se repite con los derivados de aminoácido correspondientes, bajo utilización de glicinamida o formación posterior del grupo glicinamida, hasta la síntesis de la monapeptidamida S,N,S'-bloqueada, y en esta se pone en libertad el grupo amino y los grupos mercapto, y la L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-L-cisteinil-L-propil-L-isoleucil-glicinamida se oxida para llegar al compuesto S,S'-dehidro.

10.

2. Procedimiento conforme a lo definido en la reivindicación 1, caracterizado porque por una parte para la preparación del derivado pentapéptido-C-terminal, se transforma un N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cistein-alquiléster o -aralquiléster mediante tratamiento con hidracina en la N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cistein-hidracida y por último mediante ácido nitroso se transforma en la dipeptidacida correspondiente, S,N-bloqueda, ésta se hace reaccionar con L-propil-L-isoleucil-glicinamida, o se condensa la N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteina con la tripeptidamida citada mediante una carbodiimida, y la N-carbobenciloxi-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-propil-L-isoleucil-glicinamida obtenida en ambos casos se transforma mediante tratamiento con ácido bromhídrico en ácido acético glacial en la L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-propil-L-isoleucil-glicinamida, y por otra parte para la preparación del derivado tetrapéptido N-terminal se hace reaccionar un derivado funcional capaz de reaccionar de la N-carbobenciloxi-L-isoleucina, como el anhídrido mezclado con un ácido alcoxifórmico inferior o el

15.

20.

25.

30.



286566

p-nitrofeniléster, con un L-serin-alquiléster o -aralquiléster para llegar a un N-carbobenciloxi-L-isoleucil-L-serinéster o con una serin-hidracida N<sup>2</sup>-bloqueada para llegar al derivado N<sup>2</sup> correspondiente de N-carbobenciloxi-L-isoleucil-L-serin-hidracida, este o los ésteres anteriormente citados se tratan con hidrógeno activado catalíticamente, los L-isoleucil-L-serin-ésteres originados o bien el derivado N<sup>2</sup> originado de la L-isoleucil-L-serin-hidracida se condensan con S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosina mediante una carbodiimida para llegar a un S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-serin-éster o bien al derivado N<sup>2</sup> correspondiente de tetrapeptidhidracida S,N-bloqueada, los primeros por tratamiento con hidracina o bien el último por solvolisis catalítica ácida se transforman en la S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-serin-hidracida, ésta mediante acción de ácido nitroso se transforma en la S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-serinacida, esta tetrapeptidacida N-terminal, S,N-bloqueada se hace reaccionar con la pentapeptidamida C-terminal, S-bloqueada obtenido anteriormente descrita para llegar a la S-bencil-N-tosil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-propil-L-isoleucil-glicinamida, en esta se doblan los dos radicales S-bencilo y el radical S-tosilo, y la L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-seril-L-asparaginil-L-cisteinil-L-propil-L-isoleucil-glicinamida originada se transforma mediante oxígeno o ferricianuro potásico en el compuesto S,S'-dehidro, la ser<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>-oxitocina.

3. Procedimiento para la preparación de Ser<sup>4</sup>-Ile<sup>8</sup>-oxitocina (S,S'-dehidro-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-

286566



L-seril-L-asparaginil-L-cisteinil-L-prolil-L-isoleucil-glicinamida).

- Según se describe y reivindica en la presente memoria, que consta de 32 hojas, foliadas y escritas a máquina por una sola cara.
- 5.

Madrid, a 29 de Marzo de 1.963

J.R. GEIGY A.G.

p. a.

**JAIIE ISEFN MIRALLES**

**R.R.**