

303970



PATENTE DE INVENCION

303970

Case 1812/A. 37/BA/MK.

*Memoria Descriptiva*

*sobre:*

"Procedimiento para la producción de un polipepturo".

=.=.=.=.=

*Solicitante:* SANDOZ, A.G., entidad suiza, residente en Basilea, Suiza.

=.=.=.=.=

La presente invención se relaciona con un nuevo polipepturo y con un procedimiento para la producción del mismo.

5. La presente invención proporciona el tetra-cosapepturo de fórmula L-seril-L-tirosil-L-seril-L-

303970



- 2 -

-norleucil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina.

5. El tetracosapepturo del invento puede ser obtenido por métodos para la síntesis de compuestos de este tipo actualmente en uso o descritos en la literatura sobre el asunto, siendo posible unir entre sí los amino-ácidos en el orden indicado en el nombre del tetracosapepturo ya sea uno a la vez o formando primero unidades elementales de pepturos y uniendo éstas entre sí.

15. El tetracosapepturo del invento puede ser producido por ejemplo mediante tratamiento de un derivado del heptapepturo de fórmula N-carbobenzoxi-L-valil-glicil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-N-tosil-L-arginil-N-tosil-L-arginil-L-prolina con sodio en amoniaco líquido seco, condensando la L-valil-glicil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-L-arginil-  
20. L-arginil-prolina resultante con N-R-L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil- $\gamma$ -O-butil(terc.)-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-L-prolina en la que R significa un grupo protector adecuado, preferentemente un radical  
25. carbobenzoxi, acetilo, formilo, carbo-butoxi(terc.), p-nitrocarbobenzoxi o trifenilmetilo, haciendo reaccionar luego la R-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil- $\gamma$ -O-butil(terc.)-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-L-  
30. prolil-L-valil-glicil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil- $\epsilon$ -N-formil-



- L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolina resultante, en la que R tiene el significado arriba indicado con éster L-valil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina-butyl(terc.) y disociando todos los grupos protectores del tetracosapepturo protegido resultante de
5. fórmula éster R-L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil-  
- $\gamma$ -O-butyl(terc.)-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolil-L-valil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina-butyl(terc.)
10. en el que R tiene el significado arriba indicado en una o más etapas en un medio ácido.

- Los materiales iniciales para producir el
15. derivado tetracosapepturo hasta ahora desconocido de la fórmula arriba indicado, si es que han sido desconocidos hasta ahora, pueden ser obtenidos mediante métodos para la síntesis de los pepturos en uso actual o descritos en la literatura sobre el asunto, siendo posible el unir entre sí los amino-ácidos ya sea uno a la vez o formando primero unidades elementales de pepturos uniendo éstas entre sí.
- 20.

- Debe tenerse presente que el tetracosapepturo del invento también puede ser obtenido o usado en forma de sus sales de adición de ácido. Los siguientes son
25. ejemplos de ácidos adecuados para la formación de sales de adición de ácido: los ácidos acético, propiónico, glicólico, láctico, pirúvico, malónico, succínico, maleico, fumárico, tartárico, cítrico, benzoico, cinámico, salicílico, 2-fenoxi- o 2-acetoxi-benzoico, mandélico,
- 30.

302970

- 4 -



5. metansulfónico, etanosulfónico, hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico o toluenosulfónico, naftalenosulfónico y sulfanílico, los ácidos poliméricos por ejemplo los ácidos tánico, algínico, poligalacturónico o la carboximetilcelulosa y los hidrácidos de halógeno, por ejemplo ácido clorhídrico o bromhídrico, nítrico, tiocianico, sulfúrico y fosfórico.

10. El tetracosapepturo del invento y sus sales poseen propiedades biológicas y terapéuticas similares a aquéllas de la corticotropina natural también denominada ACTH en la presente descripción. Por lo tanto, su uso está indicado para el tratamiento de uno o más de los siguientes: reumatismo articular, asma bronquial, artritis, alergias, gota, urticaria, choque anafiláctico, colitis ulcerosa, lupus eritematoso, quemaduras, dermatitis exfoliativa, leucemia linfática, escleroderma, eccema y condiciones de intoxicación en el alcoholismo crónico así como para la prevención de la atrofia de la corteza suprarrenal en el tratamiento con derivados de la cortisona.

15. El tetracosapepturo del invento al ser medido de acuerdo con el método de Sayer indica una actividad que corresponde substancialmente a aquélla de la corticotropina natural.

20.

25. La corticotropina natural requiere el uso de métodos de purificación laboriosos y costosos y aún así no puede ser obtenida completamente libre de impurezas de tipo proteico de alto valor molecular que pueden causar reacciones anafilácticas peligrosas; el tetracosapepturo del invento, un compuesto sintético, puede sin embargo ser obtenido con un alto grado de

30.



pureza y libre de impurezas de tipo proteico. Además, la producción del tetracosapepturo del invento no depende de la disponibilidad de glándulas hipofisarias de las que solo hay un suministro limitado a un costo muy elevado.

5.

Una ventaja especial es que el tetracosapepturo del invento a diferencia del compuesto ya conocido L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutamil-L-histidil-L-fenil-alanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-

10.

L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina y la ACTH natural está exento de un radical de metionina cuyo radical metionina presente en la posición 4 del compuesto arriba indicado y de la

15.

ACTH es fácilmente oxidable por lo cual dichos compuestos se vuelven inactivos; el tetracosapepturo del invento contiene un radical norleucina en lugar del radical metionina presente en el compuesto arriba indicado y la ACTH cuyo radical norleucina tiene las mismas propiedades estéricas como el radical metionina pero no es fácilmente oxidable.

20.

El tetracosapepturo del presente invento puede ser administrado en forma de una preparación depósito como es el caso con la ACTH natural, por ejemplo con gelatina, carbometoxicelulosa, ácido poligalacturónico u otras sustancias poliméricas que contienen grupos ácidos.

25.

En el texto y en los dibujos se han usado las siguientes abreviaciones:

30.

CBO carbobenzoxi

303970

- 6 -



	tri	tritilo = trifenilmetilo
	(For)	formilo (en el radical $\epsilon$ -amino del radical lisina)
	(Tos)	tosilo = p-toluensulfonilo (en el radical guanido del radical arginina)
5.	OCP	2,4,5-triclorofenoxi
	OTB	butiloxi- <u>Terc.</u>
	Arg-	L-arginil
	Glu	L-glutamil
10.	Gli	glicil
	His	L-histidil
	Lis	L-lisil
	Nle	L-norleucil
	Fe	L-fenilalanil
15.	Pro	L-prolil
	Ser	L-seril
	Tri	L-triptofanil
	Tir	L-tirosil
	Val	L-valil
20.	Leu	L-leucil
	Ala	L-alanil

EJEMPLO 1: (véase la figura 1)

a) H-Val-Gli-(For)Lis-(For)Lis-Arg-Arg-Pro-OH

25. Se disuelven 12 g de CBO-Val-Gli-(For)Lis-(For)Lis-(Tos)Arg-(Tos)Arg-Pro-OH en 5 l de amoníaco líquido seco y se añaden pedazos de sodio mientras se agita enérgicamente hasta que se obtiene una coloración azul oscura estable. Se añaden 2 g de cloruro amónico, se separa el amoníaco por evaporación, se seca el residuo en un
30. alto vacío y se disuelve en 250 cc de ácido acético



- 0.2 N. Se separan las sales inorgánicas según el método de Dixon (Biochem. Biophys. Acta, 34, 251 (1959), se separa por evaporación la solución libre de sal, se disuelve el residuo en metanol y se precipita con éter etílico. Se obtiene H-Val-Gli-(For)Lis-(For)Lis-Arg-Arg-Pro-OH acetato.  $[\alpha]_D^{22} = -49^\circ$  en ácido acético 1 N.
5. b) H-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)Lis-Pro-OH
- Se disuelven 10 g de CBO-His-Fe-(Tos)Arg-Tri-Gli-(For)Lis-Pro-OH en 5 l de amoníaco líquido seco, se añaden pedazos de sodio hasta que se obtiene una coloración azul estable. Se añade cloruro amónico, se evapora la solución, se disuelve el residuo en ácido acético 0.2 N, se separan las sales inorgánicas de acuerdo con el método de Dixon (Biochem. Biophys. Acta, 34, 251 (1959), se separa por evaporación la solución libre de sal, se disuelve el residuo en metanol y se precipita con éter etílico. Se obtiene H-His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)Lis-Pro-OH monoacetato, (p.f. 180°.  $[\alpha]_D^{22} = -25^\circ$  en ácido acético 1 N) el que se disuelve con 4 g de CBO-Glu(OTB)-OCP en 50 cc de formamida dimetílica. Se deja reposar durante 2 días a la temperatura ambiente, se añade éter etílico, se filtra y se obtiene 7.1 g de CBO-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)Lis-Pro-OH, los que se disuelven en 200 cc de formamida dimetílica y se hidrogena en presencia de un catalizador de paladio. Después de filtrar y de lavar con éter etílico, se obtiene H-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)Lis-Pro-OH acetato. (p.f. 190°  $[\alpha]_D^{22} = -19^\circ$  en ácido acético 1 N).
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- c) Tri-Ser-Tir-Ser-Nle-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)

303970 1



- 8 -

Lis-Pro-Val-Gli-(For)Lis-(For)Lis-Arg-Arg-Pro-OH

- Se disuelven 6 g de H-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)lis-Pro-OH acetato y 6 g de Tri-Ser-Tir-Ser-Nle-N<sub>3</sub> en 50 cc de formamida dimetílica, se deja reposar durante
5. 16 horas, se evapora y se cristaliza el residuo de metanol caliente. Se obtienen 5.1 g de Tri-Ser-Tir-Nle-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)Lis-Pro-OH acetato (p.f. 220<sup>o</sup>  $\frac{22}{D}$  = - 23<sup>o</sup> en formamida dimetílica), los que se disuelven en 50 cc de formamida dimetílica
10. y se añade 1 g de ácido trimetil-acético. Se evapora en un alto vacío hasta la mitad de su volumen, se enfría hasta -5<sup>o</sup>, se añade 0.36 g de cloruro trimetil-acético y 0.3 g de amina trietílica. Después de 10 minutos se añade una solución de 2.8 g de H-Val-Gli-
15. (For)Lis-(For)Lis-Arg-Arg-Pro-OH acetato y 0.3 cc de amina trietílica en 200 cc de formamida dimetílica. Se deja reposar durante 4 horas y se precipita con acetona. Se obtiene Tri-Ser-Tir-Ser-Nle-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)Lis-Pro-Val-Gli-(For)Lis-(For)Lis-Arg-Arg-
20. Pro-OH trimetil acetato, el que puede ser purificado mediante filtración a través de un ácido de gel de sílice en metanol acuoso al 50%.
- EJEMPLO 2:
25. Se disuelven 4 g de Tri-Ser-Tir-Ser-Nle-Glu(OTB)-His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)Lis-Pro-Val-Gly-(For)Lis-(For)Lis-Arg-Arg-Pro-OH en 40 cc de formamida dimetílica, se añaden 40 cc de piridina y 0.6 g de ácido toluensulfónico, se evapora en un alto vacío hasta la mitad del volumen, se enfría hasta -5<sup>o</sup>, se añade una solución de 4 equivalentes de H-Val-(For)Lis-Val-Tir-Pro-OTB y 1 g de carbo
- 30.

303970



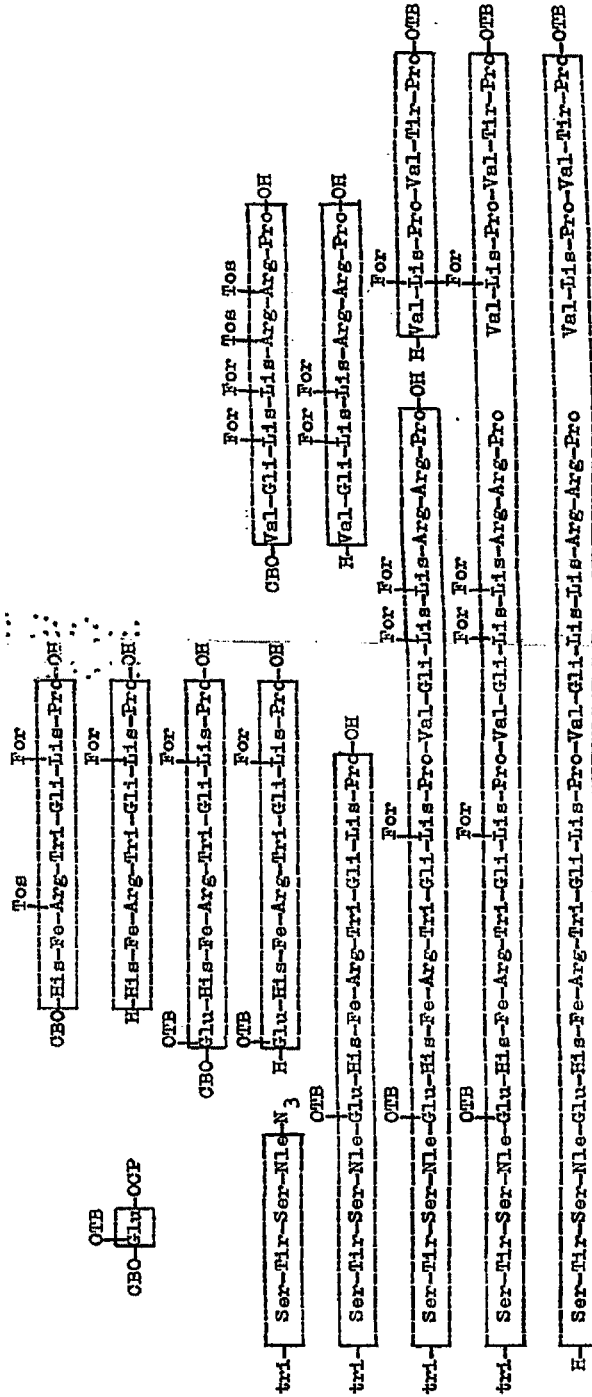
diimida dicitohexflica.

- Se deja reposar hasta el día siguiente y se añade acetona, se filtra, se seca en alto vacío y se obtienen 4 g de Tri-Ser-Tir-Ser-Nle-Glu(OTB)His-Fe-Arg-Tri-Gli-(For)Lis-Pro-Val-Gli-(For)Lis-(For)Lis-Arg-Arg-Pro-Val-(For)Lis-Val-Tir-Pro-OTB, los que se calientan en 3 l de ácido clorhídrico 0.1 N durante 3 horas a 100° en ausencia de oxígeno. Se evapora en un vacío, se lava el residuo con acetona y éter etílico y se seca en un vacío. Después de una distribución a contracorriente en el sistema ácido trifluoroacético/butanol secundario/agua (1:120:160) se obtiene 2.5 a 3.0 g de una fracción principal, la que muestra la misma efectividad como la corticotropina y un comportamiento homogéneo en la cromatografía y en la electrofóresis. Migración en la electrofóresis sobre papel a un valor pH de 5.8 y 40 V/cm: 60 mm (la histidina usada como norma migra 70 mm). Migración en la electrofóresis sobre papel a un valor pH de 1.9 y 40 V/cm: 93 mm (el ácido glutamínico usado como norma migra 81 mm bajo las mismas condiciones). Se obtiene un polipepturo de fórmula H-Ser-Tir-Ser-Nle-Glu-His-Fe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-OH. Este proporciona la siguiente composición de aminoácidos después de la hidrólisis ácida a 110° durante 16 horas: Ser<sub>2.9</sub>Tir<sub>2.0</sub>Nle<sub>1.1</sub>Glu<sub>0.9</sub>His<sub>1.1</sub>Fe<sub>1.0</sub>Arg<sub>3.1</sub>Gli<sub>1.9</sub>Cis<sub>3.9</sub>Pro<sub>2.9</sub>Val<sub>3.1</sub>. El producto puede ser usado directamente o después de convertirse en otra sal. Puede ser almacenado en forma sólida, en solución o como adsorbato.



303970

1 SEP 1964



NOTA

- 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 se refiere a una solicitud de patente presentada en Suiza, con fecha 13 de septiembre de 1963, número:
5. 11.358/63, 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 PRODUCCION DE UN POLIPEPTURO"; caracterizándose por lo siguiente:
10. 1ª.- Procedimiento para la producción de un polipepturo, especialmente el tetracosapepturo L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolyl-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina y, caracterizado porque se trata el derivado de heptapepturo N-carbobenzoxi-L-valil-glicil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-N-tosil-L-arginil-
20. N-tosil-L-arginil-L-prolina con sodio en amoniaco líquido seco, se condensa la L-valil-glicil- $\epsilon$ -N-formil-L-lysil- $\epsilon$ -N-formil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-prolina resultante con N-R-L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil-
25.  $\gamma$ -O-butil(terc.)-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-
- 30.

303070



- 12 -

- L-arginil-L-triptofanil-glicil- $\Sigma$ -N-formil-L-lisil-L-prolina, en la que R significa un grupo protector adecuado, preferentemente un radical carbobenzoxi, acetil, formil, carbobutoxi(terc.), p-nitrocarbobenzoxi o trifenilmetilo, se hace reaccionar a continuación la
5. N-R-L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil- $\gamma$ -O-butil(terc.)-L-glutamil-L-histidil-L-fenil-alanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil- $\Sigma$ -N-formil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil- $\Sigma$ -N-formil-L-lisil- $\Sigma$ -L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolina resultante, en la que R tiene el significado arriba indicado, con éster L-valil- $\Sigma$ -N-formil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina butil(terc.) y se disocian todos los grupos protectores del tetracosapepturo protegido resultante en una o más etapas en un medio ácido.
- 10.
- 15.

2ª.- "Procedimiento para la producción de un polipepturo"; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

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

Madrid,

SANDOZ, A.G.-

#/ BOMEZ ACEBO Y MODEI

11 SEP 1964