

308713



PATENTE DE INVENCION

Case 1923.

Memoria Descriptiva
sobre

"Procedimiento para la obtención de un
polipepturo".

=.=.=.=.=.=.=.=.

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

=.=.=.=.=.=.=.=.

5. La presente invención se refiere a un pro-
cedimiento para la obtención de un nuevo pentacosa-
pepturo de fórmula L-seril-L-tirosil-L-seril-L-nor-
leucil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-
L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-

308713

- 2 -



-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida y sus sales de adición de ácido.

5. El polipepturo se puede obtener ligándose entre sí los ácidos amínicos en el orden fijado en la fórmula de arriba, individualmente o después de haber formado previamente unidades de pepturo más pequeñas.
10. De acuerdo con la presente invención se puede obtener el pentacosapepturo hasta ahora desconocido de fórmula 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-lisil-L-lisil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida, por ejemplo,
15. condensando una L-valil- ϵ -N-R-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida, donde R significa un grupo carbo-terc. butoxi o un grupo carbo-terc. amiloxi, con el éster 2,4,5-triclorofenílico de la N-carbobenzoxi-L-valil-glicil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-
20. -lisil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil-L-prolina, donde R tiene el significado de arriba, la N-carbobenzoxi-L-valil-glicil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil-L-prolil-L-valil- ϵ -N-R-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida obtenida,
25. donde R tiene el significado de arriba, después de disociar el grupo carbobenzoxi, se condensa con el éster 2,4,5-triclorofenílico de la N-trifenilometilo- γ -O-butilo-terc.-L-glutamil-Im-trifenil-metil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil- ϵ -N-R-L-
30. lisil-L-prolina, donde R tiene el significado de arriba,

308713

- 3 -



29 ENE 1965

- la N-trifenilmetilo- γ -O-butilo terc.-L-glutamil-Im-trifenilmetil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil- ϵ -N-R-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil-L-prolil-L-valil- ϵ -N-R-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida obtenida, donde R tiene el significado de arriba, después de disociar el grupo trifenilmetílico, se condensa con el azuro N-R'-L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucílico, donde R' significa un grupo trifenilmetílico, un grupo carbo-terc.-butoxi o un grupo carbo-terc.-amiloxi, y todos los grupos protectores del nuevo pentacosapepturo protegido N-R'-L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil- γ -O-butilo terc.-L-glutamil-L-Im-trifenil-metil-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil- ϵ -N-R-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil- ϵ -N-R-L-lisil-L-prolil-L-valil- ϵ -N-R-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida, donde R y R' tienen el significado de arriba, se disocian en una o varias etapas en medio ácido. Los productos de partida para la obtención del derivado pentacosapeptúrico, hasta ahora desconocido, de la fórmula de arriba, siempre que hasta ahora no hubiesen sido conocidos, se pueden obtener según los métodos conocidos para la química de los pepturos, ligándose entre sí los ácidos amínicos individualmente o después de formar unidades de pepturo más pequeñas.

El pentacosapepturo nuevo obtenido según la presente invención se puede obtener y usar también en forma de sus sales. Como sales entran en consideración

3 08713



- 4 -

5. aquéllas con ácidos orgánicos, tal como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleínico, ácido fumárico, ácido tártrico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinamónico, ácido salicílico, ácido 2-fenoxi- ó 2-acetoxi-benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido benceno- ó toluenosulfónico, ácido naftalinsulfónico, ácido sulfanílico, así como los ácidos polímeros, tal como el
10. ácido tánico, ácido algínico, ácido poligalacturónico o celulosa carboximetilica y sales con ácidos inorgánicos, tal como hidrácido halógeno, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido bromhídrico, ácido nítrico, ácido
15. tiociánico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico.

El pentacosapepturo obtenido según la presente invención y sus sales poseen las mismas propiedades biológicas y terapéuticas como la corticotropina (ACTH) natural.

20. Se puede emplear por ejemplo para el tratamiento de las enfermedades siguientes:

Reumatismo articular agudo y crónico;

Colitis ulcerosa;

Nefrosis;

25. Colagenosis, tal como por ejemplo Lupus erythematodes, esclerodermia, etc.;

Enfermedades alérgicas de los distintos sistemas orgánicos, tal como Asthma bronchiale, excemas, urticaria, dermatitis exfoliativa, shock anafiláctico,

30. etc.;

308713



- 5 -

Intoxicaciones de origen diverso, tal como por ejemplo en alcoholismo crónico;

Tumores, tal como por ejemplo leucemia; linfosarcomas, reticulosarcomas, etc.;

5. Para evitar la atrofia de la corteza de las glándulas suprarrenales en la terapia con corticosteroides;

Fenómenos de insuficiencia de hipofisis.

10. Una ventaja esencial, en comparación con la hormona natural, extraída de material animal, consiste en que al pentacosapepturo sintético le faltan propiedades antigénicas. Por lo tanto se puede emplear sin impedimento alguno en las enfermedades arriba mencionadas cuando en el paciente, en el transcurso de un tratamiento anterior con el ACTH natural, se presentaban fenómenos alérgicos.

15. En los ensayos usuales y reconocidos para la estandarización posee el nuevo pentacosapepturo, en comparación con la corticotropina natural, una actividad muy elevada.

20. Mientras que la corticotropina natural solo se puede limpiar mediante penosos y costosos métodos y prácticamente siempre contiene aún impurezas albuminosas de alta molecularidad, que pueden provocar peligrosas reacciones anafilácticas puede obtenerse el nuevo compuesto sintético directamente en elevado grado de pureza y sin ninguna impureza por materiales albuminosos. Además, la obtención del nuevo compuesto sintético es independiente de la disponibilidad de glándulas hipofisarias que sólo se logran en escala

25.

30.

308713

- 6 -



- reducida y son muy caras. Una ventaja especial es que el nuevo compuesto en la posición 4 no contiene un resto metionínico como la ACTH natural que, como es sabido, oxida fácilmente y de esta manera transforma fácilmente la hormona en una forma inactivada, sino un resto norleucínico que tiene las mismas propiedades estéricas como el resto metionínico pero, por el contrario, es estable contra la oxidación. Además, el nuevo compuesto muestra en la posición 17 y 18 dos restos lisínicos en lugar de los restos arginínicos existentes en estas posiciones en el ACTH natural. De esta manera se simplificó mucho la obtención sintética del nuevo pentacosapepturo y sorprendentemente no se observó en el nuevo compuesto una bajada de la eficacia biológica.
5. El nuevo compuesto posee también en la posición 25 un resto valinamídico que en el ACTH natural no está en este lugar. Este resto valinamídico en el terminal carboxílico protege la cadena de pepturo contra encimas disociadoras, lo que es especialmente favorable en administración subcutánea o intramuscular.
10. El nuevo compuesto se puede administrar como la ACTH natural también en forma de un preparado depósito.
15. El nuevo pentacosapepturo se puede emplear como medicamento, por ejemplo, en forma de preparados farmacéuticos. Estos contienen al mencionado compuesto en mezcla con material vehículo adecuado, orgánico o inorgánico, adecuado para la aplicación parental. Como tales entran en consideración aquellos materiales que no reaccionen con el compuesto nuevo, tal como por
- 20.
- 25.
- 30.

3 08713

- 7 -



- ejemplo gelatina, lactosa, almidón, estearato de mágnésio, talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma arábica, glicoles polialquilénicos, vaselina, co-lesterina u otros vehículos medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar por ejemplo en forma líquida como soluciones, suspensiones o emulsiones. En caso dado estarán esterilizados y/o contendrán materiales auxiliares, tales como medios de conservación, estabilización, humectación o emulsión.
5. También pueden contener otros materiales terapéuticamente valiosos.
- 10.

- El pentacosapepturo obtenido según el presente procedimiento y, sus sales, pueden emplearse también como producto intermedio para la preparación de preparados farmacéuticos. En el transcurso de la síntesis se utilizaron preferentemente el éster 2,4,5-triclorofenílico de los ácidos carbobenzoxiamínicos o en ocasiones los carbobenzoxipepturos.
- 15.

- En la síntesis del nuevo pentacosapepturo se han acreditado para el bloqueo del grupo amínico del resto serínico los grupos trifenilmetílico, carbo-terc.-butoxi y carbo-terc.-amiloxi, pero también se pueden emplear otros grupos protectores adecuados, tales como el grupo carbobenzoxi, trifluoroacetílico, el grupo acetílico, cloroacetílico y formílico.
- 20.
- 25.

- Para el bloqueo del grupo ϵ -amínico del resto lisínico se han acreditado el grupo carbo-terc.-butoxi y el grupo carbo-terc.-amiloxi, pero también se pueden emplear otros grupos protectores adecuados, tal como el grupo carbobenzoxi, toluenosulfonílico, el gru-
- 30.

308713

- 8 -



po ftalílico, formílico y el grupo trifluoroacetílico.

Para el bloqueo del grupo γ -carboxílico del resto ácido glutamínico se ha acreditado el grupo butiloxi terc. pero también se pueden emplear otros grupos protectores adecuados, tales como metoxi, etoxi, el grupo amiloxi terc., el grupo amídico o el grupo benciloxi.

10. Para el bloqueo del grupo imidazólico del resto histidínico se ha acreditado el grupo trifenilmetílico, pero también se pueden emplear otros grupos protectores adecuados, tal como el grupo carbo-terc.-butoxi, carbo-terc.-amiloxi, el grupo carbobenzoxi, y el grupo bencílico.

Se emplean las siguientes abreviaciones:

15. CBO = Carbobenzoxi
Tri = Tritilo - trifenilometilo
CTB = Carbo-terc.-butiloxi
CAT = Carbo-terc.-amiloxi
OCP = 2,4,5-triclorofenoxi
20. OTB = Butiloxi terc.
OMe = Metoxi
OEt = Etoxi
Arg = L-arginilo
Glu = L-glutamilo
25. Gly = Glicilo
His = L-histidilo
Lys = L-lisilo
Nle = L-norleucilo
Phe = L-fenilalanilo
30. Pro = L-prolilo

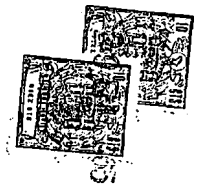
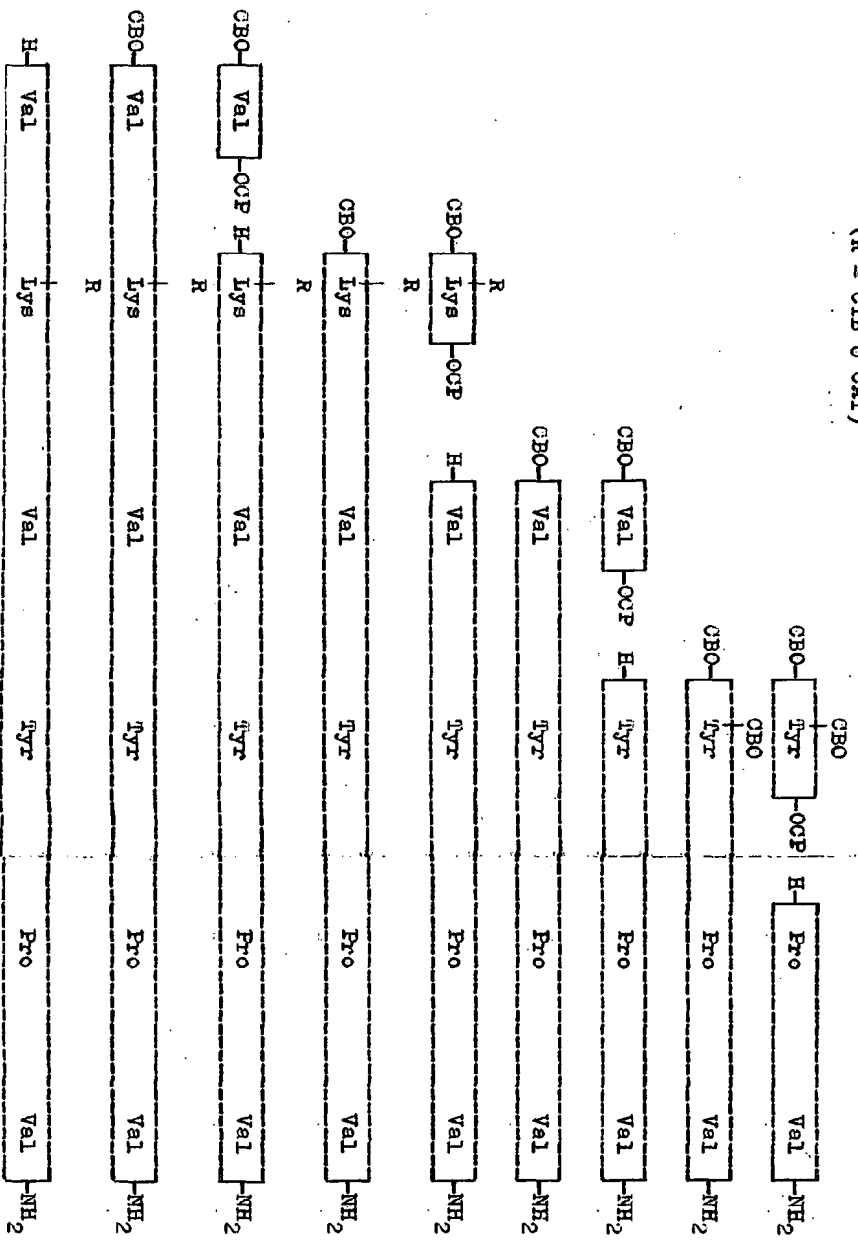
308713

9/20/51

Ser = L-serilto
 Try = L-triptofanilo
 Tyr = L-tirosilo
 Val = L-valilto.

En los ejemplos siguientes, que explican la ejecución del procedimiento y que de ninguna forma limitan, sin embargo, el alcance de la invención, se indican las temperaturas en grados Centígrados.

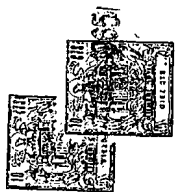
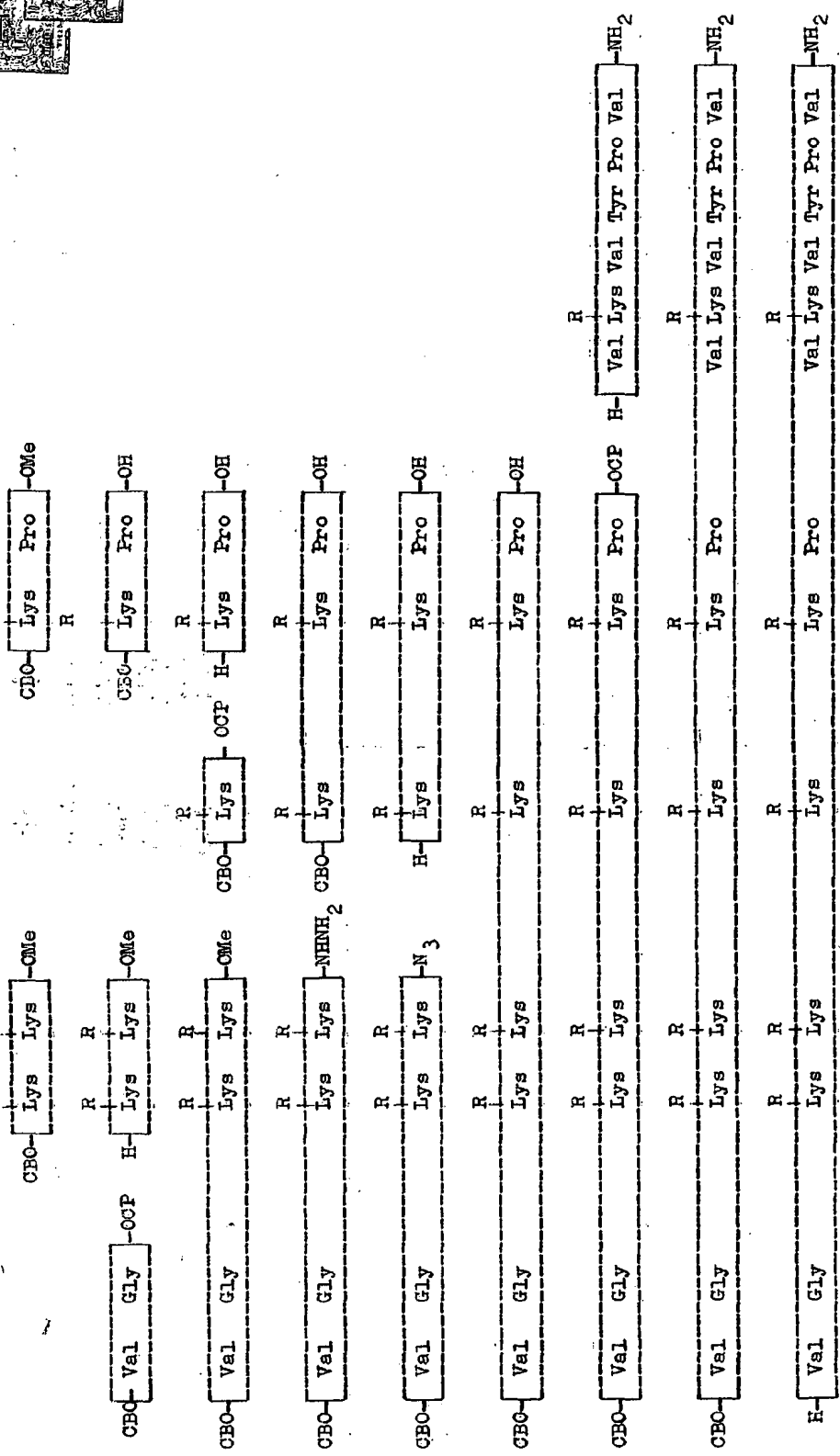
Fig. A. Obtención de H-Val-(R)Lys-(R)Val-Tyr-Pro-Val-NH₂
 (R = CMB ó GAT)



308713

10 Págs

Fig. B. Obtención de H-Val-Gly-(R)Lys-(R)Lys-(R)Lys-Pro-Val-(R)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂
(R = CTB ó CAT)





1965

Ejemplo 1: Obtención del éster 2,4,5-triclorofenílico de la α -N-carbobenzoxi- ϵ -N-carbo-terc.

butoxi-L-lisina (CBO-(CTB)Lys-OCP) (Fig. A)

5. Se disuelven 104 g de α -N-carbobenzoxi- ϵ -N-carbo-terc.-butoxi-L-lisina y 70 g de 2,4,5-tricloro fenol en 900 ml de cloroformo y 90 ml de acetonitrilo y a -10° se mezcla con 56 g de carbodiimida dicitclohexílica. Se agita durante dos horas y la úrea se filtra. Después de evaporar el disolvente se disuelve el residuo en etanol y se precipita con éter de petróleo. Después de recristalizar de etanol-agua se obtienen 140 g de éster 2,4,5-triclorofenílico de la α -N-carbobenzoxi- ϵ -N-carbo-terc.butoxi-L-lisina. P. F. 99° $[\alpha]_{D}^{22} = -11^{\circ}$ en formamida dimetílica.

15. Ejemplo 2: Obtención de la L-valil- ϵ -N-carbo-terc. butoxi-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida (H-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂) (Fig. A)

20. Se disuelven 50 g de L-prolil-L-valinamida (H-Pro-Val-NH₂) y 100 g de CBO-(CBO)Tyr-OCP en 100 ml de formamida dimetílica, se deja reposar 48 horas a 20° y se filtra. La solución se mezcla con 500 ml de ácido clorhídrico 1-n y el residuo aceitoso se disuelve en éster acético. Después de lavar con ácido clorhídrico diluido y solución de bicarbonato sódico se evapora hasta secar. Después de recristalizar de éster acético-éter dietílico se obtienen 100 g de CBO-(CBO) Tyr-Pro-Val-NH₂ (P.F. 133°). Este se mezcla con sosa cáustica 2-n y 200 ml de etanol. Se deja reposar durante una hora a temperatura ambiente y se agregan
- 25.
- 30.

308713

- 14 -



- 1000 ml de ácido clorhídrico 1-n. El residuo se lava primero con agua y, después de secar se lava con éster acético. Se obtienen 60 g de CBO-Tyr-Pro-Val-NH₂, P.F. 220° $[\alpha]_D^{21} = -23^\circ$ en formamida dimetífica. El producto obtenido se disuelve en 200 ml de una solución de bromuro de hidrógeno 4-n en ácido acético glacial y se deja reposar una hora a 20°. Después de agregar éter dietílico-éster acético se precipita el H-Tyr-Pro-Val-NH₂ como hidrobromuro P.F. 220°. Se disuelven 42 g de H-Tyr-Pro-Val-NH₂.HBr en 200 ml de formamida dimetífica y se agregan 36 g de éster N-carbobenzoxi-L-valin-2,4,5-triclorofenílico (CBO-Val-OCP) y 12 ml de amina trietífica. Se agita 48 horas a temperatura ambiente y se mezcla con 500 ml de ácido clorhídrico 1-n. El producto precipitado se disuelve en éster acético y se lava con ácido clorhídrico diluido y con solución de bicarbonato sódico. La solución éster acética se precipita con éter. Se obtienen 39 g de CBO-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂, P.F. 127°. $[\alpha]_D^{21} = -26^\circ$ en formamida dimetífica.
5. El producto obtenido se disuelve en 200 ml de una solución 4-n de bromuro de hidrógeno en ácido acético glacial y se deja reposar una hora a 20°. Después de agregar éter dietílico-éster acético se precipitan 32 g de H-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂.HBr.
10. 29 g de H-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂.HBr y 33 g de CBO-(CTB)Lys-OCP (ejemplo 1) se disuelven en 100 ml de formamida dimetífica y se mezcla con 7,5 ml de amina trietífica. Se agita 48 horas a 20°, se mezcla con 500 ml de ácido acético 1-n y el producto precipitado se lava con agua y a continuación con éster acético. Se
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

308713



- 15 -

obtienen 35 g de CBO-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ (P. F. 125°, descomp.) $[\alpha]_D^{21} = -25^\circ$ en formamida dimetílica.

5. Se disuelven 39 g de CBO-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ en 500 ml de metanol y se hidrogena a presión normal en presencia de un catalizador de paladio. Se filtra, se evapora y se trata el residuo con éter. De esta manera se obtienen 28 g de H-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. P.F. 145° (descomp.) $[\alpha]_D^{21} = -30^\circ$ en formamida dimetílica.
- 10.

- Se disuelven 33 g de H-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ y 23 g de CBO-Val-OCP en 150 ml de formamida dimetílica y se deja reposar 48 horas a 20°. La solución se evapora en vacío y el residuo se disuelve en poco n-butanol y éter acético. Después de lavar con ácido sulfúrico diluido y solución de bicarbonato sódico se evapora hasta secar. Después del tratamiento con éter dietílico se obtienen 33 g de N-CBO-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. P.F. 171° $[\alpha]_D^{21} = -27^\circ$ en formamida dimetílica.
- 15.
- 20.

- El producto obtenido se disuelve en 500 ml de metanol y a presión normal se hidrogena en presencia de un catalizador de paladio. Se filtra, se evapora en vacío y se seca a 40°. Se obtienen 22 g de N-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. $[\alpha]_D^{21} = -26^\circ$ en formamida dimetílica.
- 25.

30. Ejemplo 3: L-valil-glicil- ϵ -N-carbo-terc.butoxi-L-lisil- ϵ -N-carbo-terc.butoxi-L-lisil- ϵ -N-carbo-terc.butoxi-L-lisil- ϵ -N-carbo-terc.butoxi-L-lisil-L-prolil-L-valil- ϵ -N-carbo-

308713

- 16 -



terc.butoxi-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-
prolil-L-valinamida

(H-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-
(CTB)Lys-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-
Val-NH₂) (Fig. B)

5. Se disuelven 470 g de CBO-(CTB)Lys-OH y 182 ml de amina trietífica en 5 L de éster acético, a -5° se gotean 125 ml de éster etílico del ácido cloro-fór-mico, se agita durante 30 minutos a -5°, se agregan 190 g de H-Pro-OMe, se deja reposar 4 horas a 20°, se lava con ácido sulfúrico diluido y amoníaco y se seca y evapora. Se obtienen 550-g de dipepturo aceitoso que se disuelve en 3 L de dioxano, se enfría a 0°, se agregan 3 L de sosa cáustica (1-n) se agita 1 hora a 20°, se concentra a 3 L, se agregan 3 L de agua, se lava con éter dietílico, se enfría a 0°, se acidifica con ácido fosfórico al 10% a un pH de 2, el aceite precipitado se extrae con éster acético, se seca, se evapora, el residuo se lava con éter de petróleo y se seca. Se obtienen 470 g de CBO-(CTB)Lys-Pro-OH ($[\alpha]_D^{20} = -43^{\circ}$ en formamida dimetífica), que se disuelven en 3 L de metanol y 300 ml de agua y se hidrogena en presencia de 30 g de carbón de paladio al 10%. Se filtra, se evapora y el residuo se lava con éter dietílico. Se obtienen 323 g de H-(CTB)Lys-Pro-OH. P.F. 114° $[\alpha]_D^{20} = -52^{\circ}$ en formamida dimetífica.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

El dipepturo arriba obtenido se disuelve en 1000 ml de formamida dimetífica, se agregan 480 g de CBO-(CTB)Lys-OCP, se deja reposar 12 horas a 20°, se evapora, el residuo se disuelve en 1000 ml de bicar-

308713

- 17 -



- bonato sódico, se lava con éter dietílico, la fase acuosa se acidifica con solución de ácido cítrico al 10%, se extrae con éster acético, se seca, se evapora y el residuo se elabora con éter de petróleo. Se obtienen 308 g de CBO-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-OH (P.F. 125°) que se disuelve en 3 L de metanol y 300 ml de agua. Se hidrogena en presencia de 45 g de carbón de paladio, se filtra, se evapora y el residuo se recristaliza de dioxano-éter dietílico. Se obtienen 205 g de H-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-OH. P.F. 160° $[\alpha]_{D}^{20} = -24^{\circ}$ en formamida dimetánica. Se disuelven 380 g de CBO-(CTB)Lys-OH y 260 g de H-(CTB)Lys-OMe en una mezcla de 1500 ml de acetonitrilo y 300 ml de formamida dimetánica, se enfría a -20°, se agregan 206 g de dicitclohexilo-carbodiimida, se agita a -5° durante 12 horas, se filtra, se evapora, el residuo se disuelve en éster acético, se lava con ácido sulfúrico diluido y solución de amoníaco, se seca, se evapora y el residuo se cristaliza de éter dietílico/éter de petróleo. Se obtienen 410 g de CBO-(CTB)Lys-(CTB)Lys-OMe. P.F. 105° $[\alpha]_{D}^{20} = -10^{\circ}$ en metanol.
- El éster dipeptúrico arriba obtenido se disuelve en 3 L de metanol, se hidrogena en presencia de 50 g de catalizador de paladio y después de filtrar se evapora. El residuo se disuelve en 1000 ml de formamida dimetánica, se agregan 310 g de CBO-Val-Gly-OCP, se deja reposar 12 horas a 20°, se evapora, se elabora con éter etílico, se recristaliza de metanol-agua (1:1) y se seca. Se obtienen 448 g de CBO-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-OMe. P.F. 191° . $[\alpha]_{D}^{20} = -16^{\circ}$ en metanol. El

308713



- 18 -

- éster tetrapeptúrico así obtenido se disuelve en 600 ml de metanol, se agregan 200 ml de hidrato hidracínico, se deja reposar 16 horas a 20°, se vierte en 2 L de agua, se filtra, se lava con agua, se seca sobre
5. ácido sulfúrico, se disuelve en metanol, se vierte en éster, se filtra y se seca. Se obtienen 366 g de CBO-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-NH₂. P.F. 204-206° $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ en formamida dimetílica.
10. Se disuelven 48,2 g de CBO-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-NH₂ en una mezcla enfriada a -10° de 400 ml de formamida dimetílica, 100 ml de isopropanol y 60 ml de ácido clorhídrico 4-n, agitando fuertemente se go-tean 14 ml de una solución de nitrito sódico 5-n, se agita aún durante 5 minutos a -5°, se agregan 35 ml
15. de amina trietílica y a continuación 1000 ml de agua de hielo, se aspira exactamente, la precipitación se disuelve en 200 ml de formamida dimetílica, se agregan 28,5 g de H-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-OH y 7 ml de amina trietílica, se concentra por evaporación en alto vacío
20. a 180 ml, se deja reposar 16 horas a 0°, se agregan 1500 ml de éster acético, se lava con ácido acético diluído, el éster acético se evapora, el residuo se vierte en 2 L de agua, se filtra y se seca sobre hidróxido sódico. Se obtienen 42 g de CBO-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys
25. (CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-OH. P.F. 156° con descomposición. $[\alpha]_D^{20} = -5^\circ$ en formamida dimetílica.
30. El heptapepturo así obtenido se disuelve en 160 ml de piridina abs., se evapora, el residuo se disuelve en piridina abs. se agregan 22 g de trifosfito 2,4,5-triclorofenílico, se agita 16 horas a 20°, se

308713

- 19 -



- evapora, el residuo se disuelve en éster acético, se lava con ácido sulfúrico diluido y a continuación con solución de bicarbonato sódico 1-n, se seca sobre sulfato sódico, se evapora y el residuo se cristaliza de éster acético/éter de petróleo. Se obtienen 44 g de CBO-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-OCP que inmediatamente se disuelve en 150 ml de formamida dimetífica, se agregan 38 g de H-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂, se deja reposar dos días a 20°, se precipita mediante adición de éter dietílico, se filtra y se seca. El producto obtenido se disuelve en metanol-agua (8:2), se trata con un intercambiador de iones ácido, se evapora y el residuo se cristaliza de etanol-agua (8:2). Se obtienen 45,5 g de CBO-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. P.F. 198° con descomposición, $[\alpha]_D^{20} = +5^\circ$ en formamida dimetífica. El tridecapepturo obtenido se disuelve en 500 ml de metanol, se hidrogena en presencia de 5 g de carbón de paladio, se filtra, se evapora y el residuo se elabora con éter dietílico. Se obtienen 26,3 g de H-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. P.F. 198°.

- Ejemplo 4: Ester 2,4,5-triclorofenilico de la tritilo-O-terc.butilo-L-glutamyl-im-tritil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil- ϵ -N-carbo-terc.butoxi-L-lisil-L-prolina.
(Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-OCP) (fig. C)

308713

- 20 -



5. Se disuelven 300 g de CBO-(NO₂)Arg-Try-Gly-OMe en 5 L de dioxano-agua (8:2), se agregan 720 ml de sosa cáustica 1-n, se deja reposar una hora a 20°, se vierte en 16 L de ácido sulfúrico 0,05-n, la precipitación se aspira, se lava con agua, alcohol, éter dietílico y éter de petróleo, y se seca. Se obtienen 285 g de CBO-(NO₂)Arg-Try-Gly-OH. (P.F. 225° $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ en formamida dimetílica), que se disuelve en 3,5 L de piridina absoluta. Se agregan 250 g de Trifosfito 2,4,5-
10. tricolorofenílico, se agita 16 horas a 20°, se evapora, se disuelve en éster acético, se lava con ácido sulfúrico diluido, se seca y se evapora. El residuo se cristaliza de éster acético-éter dietílico y se obtienen 370 g de CBO-(NO₂)Arg-Try-Gly-OCP. P.F. 124° $[\alpha]_D^{20} = -9^\circ$ en formamida dimetílica.
15. El éster tripeptúrico, así obtenido, se disuelve en 700 ml de formamida dimetílica, se agregan 220 g de H-(CTB)Lys-Pro-OH (Ejemplo 3), se agita 16 horas a 20°, se precipita con éter dietílico, se filtra, la precipitación se disuelve en éster acético-
20. agua, se lava con ácido cítrico 1-n, se seca y se evapora. El residuo se cristaliza dos veces de éster acético. Se obtienen 370 g de CBO-(NO₂)Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-OH. P.F. 142° $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ en formamida dimetílica.
25. Se disuelven 245 g de CBO-(NO₂)Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-OH en 450 ml de ácido acético glacial, se agregan 50 ml de agua y 50 g de carbón de paladio al 10%, se hidrogena, filtra, evapora, disuelve en agua, liofiliza y seca sobre sosa cáustica. Se obtienen 135 g de
30. H-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-OH. $[\alpha]_D^{20} = -9^\circ$ en ácido

308713

- 21 -



- acético-agua (95:5). Se disuelven 457 g de H-His-Phe-OMe. 2HBr y 266 ml de amina trietífica en 1000 ml de formamida dimetífica, se agita 10 minutos a 0°, se filtra, al filtrado se agregan 496 g de CBO-Glu(OTB)-OCP y se
5. deja reposar durante 16 horas a 20°. Se evapora la formamida dimetífica, el residuo se disuelve en éster acético, se lava con ácido acético-diluido-agua y solución de carbonato sódico l-n, se seca sobre sulfato sódico, se evapora y el residuo se cristaliza de éster acético. Se obtienen 338 g de CBO-Glu(OTB)-His-Phe-OMe. P.F. 183° $[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$ en formamida dimetífica.
10. El tripepturo arriba obtenido se disuelve en 3 L de metanol, se hidrogena en presencia de 50 g de carbón de paladio al 10%, se filtra, evapora, el residuo se disuelve en 1,5 L de cloruro metilénico, se
15. enfría a 0°, se agregan 140 ml de amina trietífica y a continuación 270 g de clorometano trifenílico, se deja reposar durante 16 horas a 20°, se lava con ácido acético diluido, agua y solución de bicarbonato sódico l-n, se seca y se evapora. El residuo se disuelve en
20. éter dietílico y se precipita con éter de petróleo. Se obtienen 483 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-OMe, (P.F. 80° con descomposición), que se disuelven en 1000 ml de metanol. Se agregan 50 ml de hidracina, se
25. deja reposar 24 horas a 20°, se concentra a 500 ml, se agregan 5 L de éter dietílico, se lava con solución de sal común 0,1-n, se seca, se concentra a 500 ml y se precipita con éter de petróleo. Se obtienen 390 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-NHNH₂. P.F. 80° con des-
30. comp. $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ en formamida dimetífica.

308713

- 22 -

20



- Se disuelven 41,6 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri) His-Phe-NHNH₂ en 100 ml de formamida dimetílica y 100 ml de isopropanol, se enfría a -10° y se agregan 40 ml de ácido clorhídrico 4-n, a continuación y agitando se agregan 9 ml de solución de nitrito sódico 5-n. Después de 5 minutos se agregan 28 ml de amina trietílica y 1000 ml de agua de hielo, se filtra en vacío, la precipitación se disuelve en éster acético, se lava con una solución saturada de sal común, se seca, se evapora a 0°, el residuo se disuelve en 100 ml de formamida dimetílica, se agregan 26 g de H-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-OH, 3AcOH y 4,5 ml de amina trietílica, se deja reposar 16 horas a 0°, se agregan 1000 ml de éster acético, se lava con ácido acético 0,5-n, agua y piridina 0,5-N, se evapora, el residuo se disuelve en 100 ml de éster acético y se precipita con éter dietílico. Se obtienen 46,4 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-OH. P.F. 180° ²⁰ $\left[\frac{D}{D} \right] = -1,3^{\circ}$ en formamida dimetílica. El pepturo arriba obtenido se disuelve en 200 ml de piridina, se enfría a -20°, se agregan 30 ml de una solución 1-n de ácido clorhídrico en dioxano, se agita 5 minutos a -20°, se agregan 7,8 ml de amina trietílica, se concentra a la mitad del volumen, se agregan 30 g de trifosfito triclorofenílico, se deja reposar 16 horas a 20°, se evapora, el residuo se elabora con éter dietílico, se disuelve en éster acético, se precipita con éter dietílico, se filtra y se seca. Se obtienen 51,6 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-OCP. HCl. P.F. 170° con descomposición. ²⁰ $\left[\frac{D}{D} \right] = -20^{\circ}$ en



formamida dimetífica.

5. Ejemplo 5: 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-lisil-L-lisil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida
(H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂) (Fig. D)
10. Se disuelven 174 g de Tri-Ser-OH y 117 g de H-Tyr-OMe en una mezcla de 2 L de acetonitrilo, 1 L de cloroformo y 50 ml de formamida dimetífica, se enfría a -10°, se mezcla con 124 g de carbodiimida dicitclohexílica y se agita durante 5 horas a 20°. Se filtra, se lava con 1,5 L de piridina, los filtrados reunidos se evaporan hasta secar y el residuo se cristaliza de éster acético caliente. Se obtienen 221 g de Tri-Ser-Tyr-OMe. P.F. 232° $[\alpha]_D^{21} = -34^\circ$ en formamida dimetífica.
15. El producto obtenido se disuelve en 500 ml de formamida dimetífica y se mezcla con 100 ml de hidracina. Se deja reposar 24 horas a 20°, la solución se vierte en 5 L de agua, se centrifuga, el residuo aceitoso se disuelve en 2 L de éster acético y la solución obtenida se lava con agua hasta estar neutra. Se seca con sulfato sódico, se evapora hasta secar y el residuo se lava con éter. Se obtienen 182 g de Tri-Ser-Tyr-NHNH₂. P.F. 120° (con descomp.) $[\alpha]_D^{21} = -30^\circ$ en formamida dimetífica.
20. Se disuelven 131 g de CBO-Ser-OH y 95 g de
- 25.
- 30.

308713

29



- 24 -

H-Nle-OMe, hidrocioruro en 2 L de cloroformo y 70 ml de amina trietífica, se enfría a -10° , se mezcla con 124 g de carbodiimida dicitclohexílica y se agita 5 horas a 20° . Se filtra, el filtrado se evapora, el residuo se lava con éter de petróleo y agua y se seca. Se cristaliza de acetato etílico/éter de petróleo y se obtienen 151 g de CBO-Ser-Nle-OMe. P.F. 71° $[\alpha]_D^{22} = -19^{\circ}$ en metanol. Se disocia el grupo CBO por hidrogenación catalítica en metanol en presencia de un catalizador de paladio y una cantidad equivalente de cloruro de hidrógeno. Después de separar el catalizador, evaporar y mezclar con éter etílico se obtiene el H-Ser-Nle-OMe hidrocioruro.

Se disuelven 46 g de Tri-Ser-Tyr-NHNH₂ en una mezcla de 120 ml de formamida dimetífica, 120 ml de isopropanol y 120 ml de agua, se enfría a -10° , se agregan 44 ml de ácido clorhídrico 6-n y se mezcla agitando fuertemente con 3,5 g de nitrito sódico. Después de 5 minutos se agregan 250 ml de bicarbonato potásico 1-n y 1500 ml de agua. Se aspira, el producto sólido se disuelve en 200 ml de formamida dimetífica, se agregan 24 g de H-Ser-Nle-OMe-hidrocioruro y 23 ml de amina trietífica y se deja reposar 16 horas a 20° .

La solución se vierte en 1000 ml de agua, se extrae con éter acético, se seca sobre sulfato sódico, y se evapora. Después de lavar el residuo con éter se obtienen 56,5 g de Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-OMe. P.F. $130-140^{\circ}$ (con descomp.) $[\alpha]_D^{20} = -7^{\circ}$ en formamida dimetífica.

El producto obtenido se disuelve en 200 ml

308713

- 25 -



- de etanol caliente, se mezcla con 3 ml de hidracina, se deja reposar 24 horas a 20°, se agregan 200 ml de éter, se filtra, se lava con éter y se seca en vacío sobre pentóxido de fósforo y ácido sulfúrico conc. Se
5. obtienen 51 g de Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-NH-NH₂. P.F. 205°. Se disuelven 6,1 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-OCP.HCl y 5,7 g de H-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ en 20 ml de formamida dimetílica,
10. se agregan 3,0 g de imidazol y se deja reposar durante 3 días a 20°. Se agregan aún 0,6 g del mismo octapepturo-hidrocloruro, se deja aún durante 16 horas a 20°, se precipita con éster acético, se filtra, la precipitación se disuelve en etanol, se precipita con éster acético,
15. se filtra, la precipitación se disuelve en etanol, se precipita con éster acético, se filtra y se seca. Se obtienen 8,0 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-Val-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ (P.F. 195° con descomposición. $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ en formamida dimetílica), que se disuelve en 200 ml de ácido acético-agua (8:2), se deja durante 2 horas a 30°, se evapora, se lava con éster acético, se filtra y se seca. Se obtienen 7 g de H-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂.acetato.
- 25.

- Se disuelven 1,65 g de Tri-Ser-Tyr-Nle-NH-NH₂ en 6 ml de formamida dimetílica, se agregan 2 ml
30. de agua, se enfría a -10°, se agrega 1 ml de ácido

308713

- 26 -

29



- clorhídrico 1-n, se mezcla con 140 ml de nitrito sódico, se agita 5 minutos a -5° , se agregan 300 ml de solución de bicarbonato potásico 0,2-n y se centrifuga. El Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle- N_3 obtenido se disuelve en 50
5. ml de formamida dimetífica, se mezcla con 5,02 g de H-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-Val-Gly-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-(CTB)Lys-Pro-Val-(CTB)Lys-Val-Tyr-Pro-Val- NH_2 .acetato, se deja reposar durante 12 horas a 0° , se agrega otra cantidad de azuro
10. del tetrapepturo obtenida de 1 g de Tri-Ser-Tyr-Nle- $NHNH_2$, se deja durante 6 horas a 0° , se evapora, se elabora con éster acético, se lava con acetona caliente y éster acético y se seca en vacío. El producto obtenido se disuelve en 100 ml de ácido trifluoroacético, se deja reposar durante 1 hora a 20° bajo nitrógeno, se elabora con éster acético, se filtra y se seca. El producto obtenido se disuelve en 500 ml de ácido acético 0,2-n, se trata la solución con Amberlita-IRA-410 en forma de acetato, se filtra y liofiliza. Después de secar sobre hidróxido sódico se obtienen 3,5 g de H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Tyr-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Val- NH_2 .acetato que en la cromatografía y electrofóresis se comporta homogéneamente. (La hidrólisis total da la siguiente composición de aminoácidos:
15. Ser_{1,8} Tyr_{1,9} Nle_{1,0} Glu_{0,9} His_{1,1} Phe_{1,0} Arg_{1,1} Gly_{2,0} Lys_{6,1} Pro_{2,9} Val_{4,0}, Try se descompone como es sabido por la hidrólisis total ácida). El producto se puede utilizar como tal o después de transformar en otra sal. Se puede
20. almacenar en estado sólido, en solución o como adsor-
- 25.
- 30.

308713

- 27 -



bato.

Ejemplo 6: Obtención de amilo terc.-tiofenilcarbonato

5. Se disuelven 296 ml de alcohol amílico terc. en 212 ml de piridina y 800 ml de cloroformo y a 20° se gotean 410 g de éster S-fenílico del ácido cloro-tiofórmico. Terminada la reacción se agita aún durante otras 4 horas a 70°. Se lava con ácido clorhídrico diluído, bicarbonato sódico y solución saturada de sal común. El disolvente se evapora y después de destilación fraccionada se obtienen 390 g de amilo terc.-tiofenilcarbonato (P.E. 105-107° a 4-5 mm Hg).
- 10.

Ejemplo 7: Obtención de amilo terc.-carbazato

15. Se gotean 81 g de hidrato hidracínico en 170 g de amilo terc.-tiofenilcarbonato. Aquí aumenta la temperatura a 70-80°. Se agita aún durante 6 horas y se mezcla con una solución de 47 g de hidróxido sódico en 40 ml de agua. Se extrae la mezcla así obtenida durante 24 horas continuamente con éter. La fase eterea se separa, se seca sobre sulfato sódico y el disolvente se evapora. Después de destilación fraccionada se aislan 105 g de amilo terc.-carbazato (P.E. 84° a 3 mm Hg).
- 20.

Ejemplo 8: Obtención de α -N-carbobenzoxi- ϵ -N-carbo-terc.amiloxi-L-lisina

(CBO-(CAT)Lys-OH)

25. Se disuelven 35 g de amilo terc.-carbazato en 28 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua y a -10° se gotea una solución de 40 g de nitrito sódico en 50 ml de agua. Se sigue agitando aun durante una hora y se mezcla con 300 ml de éter. La fase etérea se lava con agua y con solución de bicarbonato sódico y después
- 30.

308713

- 28 -



de secar sobre sulfato sódico se evapora. Se obtienen 35 g de amiloxi.terc.-carbonilazuro (CAT-azuro) que, debido a su peligro de explosión, no se destiló.

5. El CAT-azuro se disuelve en 200 ml de dioxano y se agrega a una mezcla de 62 g de α -N-carbobenzoxi-L-lisina, 350 ml de agua y 15 g de óxido de magnesio. La mezcla de reacción se agita durante 16 horas a 40°, se filtra, y el dioxano se evapora a 40°. Después de agregar 400 ml de agua se acidifica con ácido sulfúrico diluido y se extrae con éster acético.
10. Después de secar sobre sulfato sódico se evapora el disolvente en vacío. Se obtienen 57 g de CBO-(CAT)Lys-OH $[\alpha]_D^{22} = -12^\circ$ en formamida dimetífica.

15. Para la caracterización se disuelven 20 g de CBO-(CAT)Lys-OH y 9 g de amina dicitclohexilica en 50 ml de éter y se deja reposar 2 horas a 20°. El producto cristalizado se filtra y se lava ulteriormente con éter. Se obtienen 22 g de la sal dicitclohexilamínica del CBO-(CAT)Lys-OH. P.F. 130°.

20. Ejemplo 9: Obtención del éster metílico de la α -N-carbobenzoxi- ϵ -N-carbo-terc.amiloxi-L-lisina
(CBO-(CAT)Lys-OMe)

25. Se disuelven 24 g de α -N-carbobenzoxi- ϵ -N-carbo-terc.amiloxi-L-lisina en 100 ml de éter y se gotea una solución etérea de diazometano hasta que el teñido amarillo se mantenga igual. El disolvente se evapora en vacío y el residuo se seca en alto vacío sobre pentóxido de fósforo. Se obtienen 23 g de éster metílico de la α -N-carbobenzoxi- ϵ -N-carbo-terc.
- 30.



amiloxi-L-lisina como aceite viscoso que cristaliza en el transcurso de algunos días. (P.F. 38-41°).

Ejemplo 10: Obtención del éster 2,4,5-triclorofenílico de la α -N-carbobenzoxi- ϵ -N-carbo-terc.-

5.

amiloxi-L-lisina

(CBO-(CAT)Lys-OCP)

Se disuelven 24 g de CBO-(CAT)Lys-OH y 13 g de 2,4,5-triclorofenol en 100 ml de éster acético y a 0° se mezcla con 14 g de carbodiimida dicitclohexílica. Se agita durante 16 horas a 20°, se filtra de la úrea dicitclohexílica, el disolvente se evapora y se cristaliza de etanol-agua. Se obtienen 32 g de éster 2,4,5-triclorofenílico de la α -N-carbobenzoxi- ϵ -N-carbo-terc.amiloxi-L-lisina del P.F. 78° $[\alpha]_D^{22} = -12^\circ$ en formamida dimetílica.

10.

15.

Ejemplo 11: Obtención de L-valilo- ϵ -N-carbo-terc.

amiloxi-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-

L-valinamida

(H-Val-(CAT)Lys, Val-Tyr-Pro-Val-NH₂)

20.

(Fig. A)

32 g de H-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂.HBr, 37 g de CBO-(CAT)Lys-OCP (Ej. 10) se disuelven en 150 ml de formamida dimetílica y se mezcla con 8 ml de amina trietílica. Se agita durante 48 horas a 20°, se precipita con 500 ml de ácido acético 1-n y el producto precipitado se lava con agua y éster acético. Se obtienen 39 g de CBO-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ $[\alpha]_D^{21} = -26^\circ$ en formamida dimetílica.

25.

30.

Se disuelven 38 g de CBO-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ en 500 ml de metanol y se hidrogena 6

308713

- 30 -

29



- horas a presión normal en presencia de un catalizador de paladio. Se filtra y se evapora el disolvente en vacío. Se obtienen 32 g de H-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. $[\alpha]_D^{22} = -29^\circ$ en formamida dimetífica. 32 g de H-(CAT)Lys-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ y 22 g de CBO-Val-OCP se disuelven en 100 ml de formamida dimetífica y se deja reposar durante 48 horas a 20°. La formamida dimetífica se evapora en vacío y el residuo se disuelve en poco n-butanol y éster acético.
5. Se lava con ácido sulfúrico diluido y solución de bicarbonato sódico. Después de secar sobre sulfato sódico se evapora el disolvente en vacío. Se obtienen 36 g de CBO-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. $[\alpha]_D^{22} = -25^\circ$ en formamida dimetífica.
10. Se disuelven 36 g de CBO-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ en 500 ml de metanol y se hidrógena en presencia de un catalizador de paladio durante 6 horas a presión normal. Se filtra, el metanol se evapora en vacío y el residuo aceitoso se trata con éter dietílico.
15. Se obtienen 26 g de H-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. $[\alpha]_D^{22} = -27^\circ$ en formamida dimetífica.
20. Ejemplo 12: L-valil-glicil- ϵ -N-carbo-terc.-amiloxi-L-lisil- ϵ -N-carbo-terc.-amiloxi-L-lisil- ϵ -N-carbo-terc.-amiloxi-L-lisil- ϵ -N-carbo-terc.-amiloxi-L-lisil-L-prolil-L-valil- ϵ -N-carbo-terc.-amiloxi-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida (H-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ (Fig. B)
- 25.
- 30.

308713



5. Se disuelven 186 g de CBO-(CAT)Lys-OH y 73 ml de amina trietífica en 2 L de éster acético, a -5° se gotean 50 ml de éster etílico del ácido cloro-fórmico, se agita durante 30 minutos a -5° , se agregan 76 g de H-Pro-OMe, se deja reposar durante 4 horas a 20° , se lava con ácido sulfúrico diluido y amoníaco, se seca y se evapora. Se obtienen 230 g de dipepturo aceitoso que se disuelve en 1,3 L de dioxano, se enfría a 0° , se agregan 1,3 L de sosa cáustica l-n, se
10. agita 1 hora a 20° , se concentra a 1,3 L, se agregan 1,3 L de agua, se lava con éter dietílico, se enfría a 0° , se acidifica con ácido fosfórico al 10% a un pH de 2, el aceite precipitado se extrae con éster acético, se seca, se evapora, el residuo se lava con
15. éter de petróleo y se seca. Se obtienen 195 g de CBO-(CAT)Lys-Pro-OH, $[\alpha]_D^{20} = -45^{\circ}$ en formamida dimetífica, que se disuelve en 3 L de metanol y 300 ml de agua y en presencia de 10 g de carbón de paladio al 10% se hidrogena. Se filtra, se evapora y el residuo
20. se lava con éter dietílico. Se obtienen 130 g de H-(CAT)Lys-Pro-OH. P.F. 104° . $[\alpha]_D^{20} = -55^{\circ}$, en formamida dimetífica. El dipepturo arriba obtenido se disuelve en 400 ml de formamida dimetífica, se agregan 195 g de CBO-(CAT)Lys-OCP, se deja reposar 12 horas a
25. 20° , se evapora, el residuo se disuelve en 400 ml de solución de bicarbonato sódico l-n, se lava con éter dietílico, la fase acuosa se acidifica con solución de ácido cítrico al 10%, se extrae con éster acético, se seca y el residuo se elabora con éter de petróleo.
30. Se obtienen 124 g de CBO-(CAT)Lys-Pro-OH (P.F. 120°)

308713

29



- 32 -

- que se disuelve en 1,3 L de metanol y 100 ml de agua. Se hidrogena en presencia de 10 g de carbón de paladio, se filtra, se evapora y el residuo se recristaliza de dioxano-éter dietílico. Se obtienen 84 g de
5. H-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-OH. P.F. 140^o $[\alpha]_D^{22} = -26^{\circ}$ en formamida dimetánica. Se disuelven 150 g de CBO-(CAT)Lys-OH y 105 g de H-(CAT)Lys-OMe en una mezcla de 500 ml de acetónitrilo y 100 ml de formamida dimetánica, se enfría a -20^o, se agregan 83 g de carbodiimida dicitclohexánica, se agita a -5^o durante 12 horas, se filtra, evapora, el residuo se disuelve en éster acético, se lava con ácido sulfúrico diluido y solución de amoníaco, se seca, se evapora y el residuo se cristaliza de éter dietílico-éter de petróleo.
10. Se obtienen 168 g de CBO-(CAT)Lys-(CAT)Lys-OMe. P.F. 103^o $[\alpha]_D^{20} = -12^{\circ}$ en metanol. El éster dipeptídico arriba obtenido se disuelve en 1 litro de metanol, se hidrogena en presencia de 15 g de catalizador de paladio y después de filtrar se evapora. El residuo se disuelve en 400 ml de formamida dimetánica, se agregan 125 g de CBO-Val-Gly-OCP, se deja reposar durante 12 horas a 20^o, se evapora, se elabora con éter étílico, se recristaliza de metanol-agua (1:1) y se seca. Se obtienen 180 g de CBO-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-OMe.
15. P.F. 175^o $[\alpha]_D^{20} = -18^{\circ}$ en metanol. El éster tetrapeptídico así obtenido se disuelve en 200 ml de metanol, se agregan 80 ml de hidrato hidracínico, se deja reposar 16 horas a 20^o, se vierte en 1 L de agua, se filtra, se lava con agua, se seca sobre ácido sulfúrico, se disuelve en metanol, se vierte en éter, se
- 20.
- 25.
- 30.

308713

- 33 -



filtra y se seca. Se obtienen 147 g de CBO-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-NHNH₂. P.F. 200°. $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ en formamida dimetílica.

5. Se disuelven 25,0 g de CBO-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-NHNH₂ en una mezcla enfriada a -10° de 200 ml de formamida dimetílica, 50 ml de isopropanol y 30 ml de ácido clorhídrico 4-n, agitando fuertemente se go-tean 7 ml de una solución acuosa de nitrito sódico 5-n, se agita aún durante 5 minutos a -5°, se agregan 18 ml de amina trietílica y a continuación 500 ml de agua de hielo, se aspira exactamente, se disuelve la precipitación en 100 ml de formamida dimetílica, se agregan 15,0 g de H-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-OH y 3,5 ml de amina trietílica, se concentra por evaporación en alto vacío a 90 ml, se deja reposar durante 16 horas a 0°, se agregan 800 ml de éster acético, se lava con ácido acético diluido, se evapora el éster acético, el residuo se vierte en 1 L de agua, se filtra y se seca sobre hidróxido sódico; se obtienen 25 g de CBO-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-OH. P.F. 150° con descomposición. $[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$ en formamida dimetílica.
- 10.
- 15.
- 20.

25. Se disuelve el heptapepturo así obtenido en 80 ml de piridina abs., se evapora, el residuo se disuelve en 80 ml de piridina abs., se agregan 10 g de trifosfito 2,4,5-triclorofenílico, se agita durante 16 horas a 20°, se evapora, el residuo se disuelve en éster acético, se lava con ácido sulfúrico diluido y a continuación con solución de bicarbonato sódico 1-n, se seca sobre sulfato sódico, se evapora y el residuo
- 30.

308713

29



- 34 -

- se cristaliza de éster acético/éter de petróleo. Se obtienen 26 g de CBO-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-OCP que inmediatamente se disuelven en 75 ml de formamida dimetífica, se agregan 20 g de H-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂, se deja reposar durante 2 días a 20°, se precipita mediante adición de éter dietílico, se filtra y se seca. El producto obtenido se disuelve en metanol/agua 8:2, se trata con un intercambiador de iones ácido, se evapora y el residuo se cristaliza de etanol-agua 8:1. Se obtienen 15,0 g de CBO-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. P.F. 190° con descomposición. $[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$ en formamida dimetífica. El tridecapepturo obtenido se disuelve en 500 ml de metanol, se hidrogena en presencia de 5 g de carbón de paladio, se filtra, se evapora y el residuo se elabora con éter dietílico. Se obtienen 12 g de H-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂. P.F. 198°.
20. Ejemplo 13: Ester 2,4,5-triclorofenílico de tritilo-O-butilo-terc-L-glutamil-Im-tritil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-N-ε-carbo-terc.amiloxi-L-lisil-L-prolina
(Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CAT)Lys-Pro-OCP) (Fig. C)

- Se disuelven 100 g de CBO-(NO₂)Arg-Try-Gly-OMe en 1,5 L de dioxano/agua (8:2) se agregan 250 ml de sosa cáustica 1-n, se deja reposar 1 hora a 20°, se vierte en 5 L de ácido sulfúrico 0,05-n, la precipitación se aspira, se lava con agua, alcohol, éter

308713

- 35 -



5. dietílico y éter de petróleo y se seca. Se obtienen 95 g de CBO-(NO₂)Arg-Try-Gly-OH, (P.F. 225° $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ en formamida dimetílica) que se disuelve en 1,1 L de piridina abs. Se agregan 85 g de trifosfito 2,4,5-triclorofenílico, se agita 16 horas a 20°, se evapora, se disuelve en éster acético, se lava con ácido sulfúrico diluido, se seca y se evapora. El residuo se cristaliza de éster acético/éter dietílico y contiene 125 g de CBO-(NO₂) Arg-Try-Gly-OCP. P.F. 124°
10. $[\alpha]_D^{20} = -9^\circ$ de formamida dimetílica. Se disuelve el éster tripeptúrico así obtenido en 240 ml de formamida dimetílica, se agregan 750 g de H-(CAT)Lys-Pro-OH (Ejemplo 12), se agita 16 horas a 20°, se precipita con éter dietílico, se filtra, la precipitación se disuelve en éster acético/agua, se lava con ácido cítrico l-n, se seca y se evapora. El residuo se cristaliza dos veces de éster acético. Se obtienen 125 g de CBO-(NO₂)Arg-Try-Gly-(CAT)Lys-Pro-OH. P.F. 140°
15. $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ en formamida dimetílica.
20. Se disuelven 85 g de CBO-(NO₂)Arg-Tri-Gly-(CAT)Lys-Pro-OH en 450 ml de ácido acético glacial, se agregan 50 ml de agua y 50 g de carbón de paladio al 10%, se hidrogena, se filtra, se evapora, se disuelve en agua, se liofiliza y se seca sobre sosa cáustica.
25. Se obtienen 46 g de H-Arg-Try-Gly-(CTB)Lys-Pro-OH $[\alpha]_D^{20} = -9^\circ$ en ácido acético-agua (95:5).
30. Se disuelven 61,5 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-NHNH₂ (Ejemplo 4) en 150 ml de formamida dimetílica y 150 ml de isopropanol, se enfría a -10° y se agregan 60 ml de ácido clorhídrico 4-n y, a continuación, agi-



- tando 13,5 ml de solución de nitrito sódico. Después de 5 minutos se agregan 42 ml de amina trietilica y 1500 ml de agua de hielo, se filtra en vacío, la precipitación se disuelve en éster acético, se lava con
5. una solución saturada de sal común, se seca, se evapora a 0^o, el residuo se disuelve en 150 ml de formamida dimetflica, se agregan 40,0 g de H-Arg-Try-Gly-(CAT)Lys-Pro-OH. 3 AcOH y 6,0 ml de amina trietilica, se deja reposar durante 16 horas a 0^o, se agregan 1500
10. ml de éster acético, se lava con ácido acético 0,5-n, agua y piridina 0,5-n, se evapora, se disuelve el residuo en 150 ml de éster acético y se precipita con éster dietílico. Se obtienen 70 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CAT)Lys-Pro-OH. P.F. 150^o $[\alpha]_D^{20} = -15^{\circ}$ en formamida dimetflica.
- 15.

- El pepturo arriba obtenido se disuelve en 300 ml de piridina, se enfría a -20^o, se agregan 45 ml de una solución de ácido clorhídrico 1-n en dioxano, se agita 5 minutos a -20^o, se agregan 12 ml de amina trietilica, se concentra a la mitad del volumen, se agregan 45 g de trifosfito triclorofenílico, se deja reposar durante 16 horas a 20^o, se evapora, el residuo se elabora con éster dietílico, se disuelve en éster acético, se precipita con éster dietílico, se filtra y se seca. Se obtienen 78 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CAT)Lys-Pro-OCP.HCl. P.F. 170^o con descomposición: $[\alpha]_D^{20} = -20^{\circ}$ en formamida dimetflica.
- 20.
- 25.

30. Ejemplo 14: L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-

3087:3

- 37 -



5. prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-
lisil-L-lisil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-
valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida
(H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Try-
Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-Pro-
Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂) (Fig. D)

10. Se disuelven 18,5 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)-His-Phe-Arg-Try-Gly-(CAT)Lys-Pro-OCP. HCl y 18,0 g de H-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ (Ejemplo 12) en 60 cm³ de formamida dimetíllica, se agregan 9,0 g de imidazol y se deja durante 3 días a 20°. Se agregan aún 1,8 g del mismo octapepturo-hidrocloruro, se deja durante otras 16 horas a 20°, se precipita con éster acético, se filtra, la precipitación se disuelve en etanol, se precipita con éster acético, se filtra y se seca. Se obtienen 26,0 g de Tri-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CAT)Lys-Pro-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂ (P.F. 190° con descomposición. $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ en formamida dimetíllica) que se disuelve en 200 ml de ácido acético-agua (8:2), se deja reposar 2 horas a 30°, se evapora, se lava con éster acético, se filtra y se seca. Se obtienen 22 g de H-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CAT)Lys-Pro-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂.acetato.
15. Se disuelven 2,3 g de Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-NH-NH₂ (Ejemplo 5) en 12 ml de formamida dimetíllica, se agregan 4 ml de agua, se enfría a -10°, se agregan

- 20.
- 25.
- 30.

308713

- 38 -



- 2 ml de ácido clorhídrico-6-n, se mezcla con 280 mg de nitrito sódico, se agita 5 minutos a -5° , se agregan 300 ml de solución de bicarbonato potásico 0,2-n y se centrifuga. El Tri-Ser-Tyr-Ser-N₃ obtenido se
5. disuelve en 50 ml de formamida dimetílica, se mezcla con 10,5 g de H-Glu(OTB)-(Tri)His-Phe-Arg-Try-Gly-(CAT)Lys-Pro-Val-Gly-(CAT)Lys-Val-Gly-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-(CAT)Lys-Pro-Val-(CAT)Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂.acetato, se deja 12 horas a 0^o, se agrega
10. otra cantidad de azuro de tetrapepturo obtenido de 2,0 g de Tri-Ser-Tyr-Ser-Nle-NHNH₂, se deja reposar durante 6 horas a 0^o, se evapora, se elabora con éster acético, se lava con acetona caliente y éster acético y se seca en vacío. El producto obtenido se disuelve
15. en 100 ml de ácido trifluoroacético al 90%, se deja reposar durante 1 hora a 20^o bajo nitrógeno, se evapora, se elabora con éster acético, se filtra y se seca. El producto obtenido se disuelve en 500 ml de ácido acético 0,2-n, la solución se trata con amberlita-IRA-410 en forma de acetato, se filtra y se liofiliza. Después de secar sobre hidróxido sódico se
20. obtienen 7,5 g de H-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Val-NH₂.acetato, que en la cromatografía y en la electrofóresis se comporta homogéneamente.
25. (La hidrólisis total da la siguiente composición de aminoácidos: Ser_{1,8}Tyr_{1,9}Nle_{1,0}Glu_{0,9}His_{1,1}Phe_{1,0}Arg_{1,1}Gly_{2,0}Lys_{6,1}Pro_{2,9}Val_{4,0}).
- Try se descompone como es sabido en la hidrólisis total ácida. El producto se puede emplear
- 30.

308713



como tal o después de su transformación en otra sal. Se puede almacenar en estado sólido, en solución o como adsorbato.

NOTA

5. 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 31 de enero de 1964, nº 1.111/64, acogiendo, por lo tanto, a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, 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 OBTENCIÓN DE UN POLIPEPTURO"; caracterizándose por lo siguiente:
10. 1ª.- Procedimiento para la obtención de un polipepturo hasta ahora desconocido de la fórmula 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-lisil-L-lisil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida, caracterizado porque
15. de N-R'-L-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil- O-butilo terc.-L-glutamil-Im-trifenil-metil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil- E-N-R-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil- E-N-R-L-lisil- E-
20. N-R-L-lisil- E-N-R-L-lisil- E-N-R-L-lisil-L-prolil-
- 25.
- 30.

308713



- 40 -

L-valil-*E*-N-R-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-L-valinamida, donde R significa un grupo carbo-butoxi-terc. o un grupo carbo-terc.amiloxi y R' está por un grupo trifenilmetílico un grupo carbo-terc.butoxi o un grupo carbo-terc.amiloxi, en una o varias etapas, en medio ácido, se disocian los grupos protectores.

5.

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

10.

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

Madrid, 29 ENE 1965
SANDOZ, A. G.-

J. GOMEZ ACEBO Y MODEY
22