

325472  
MAY 1968

PATENTE DE INVENCION

Case 2127

37/KU/MK

=====

325472

*Memoria Descriptiva*

*sobre*

"Procedimiento para la obtención de de-amino<sup>1</sup>-Phe<sup>2</sup>-  
Arg<sup>8</sup>-vasopresina":

-----

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

-----

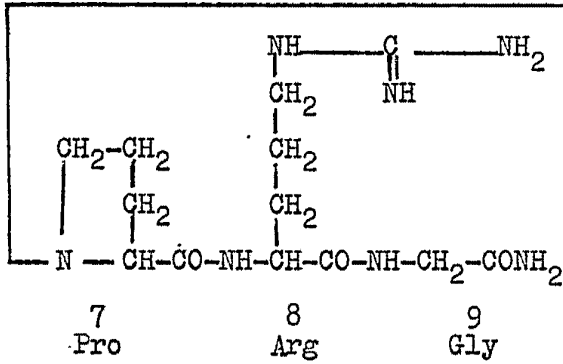
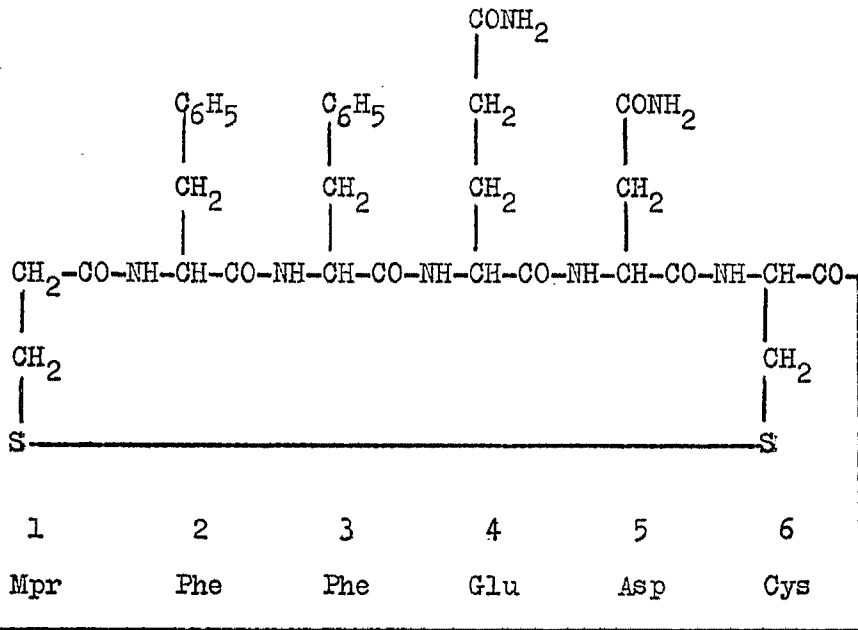
La presente invención se relaciona con un nuevo polipéptido y un procedimiento para su producción.

La presente invención proporciona el polipéptido de fórmula I,

5.



325472

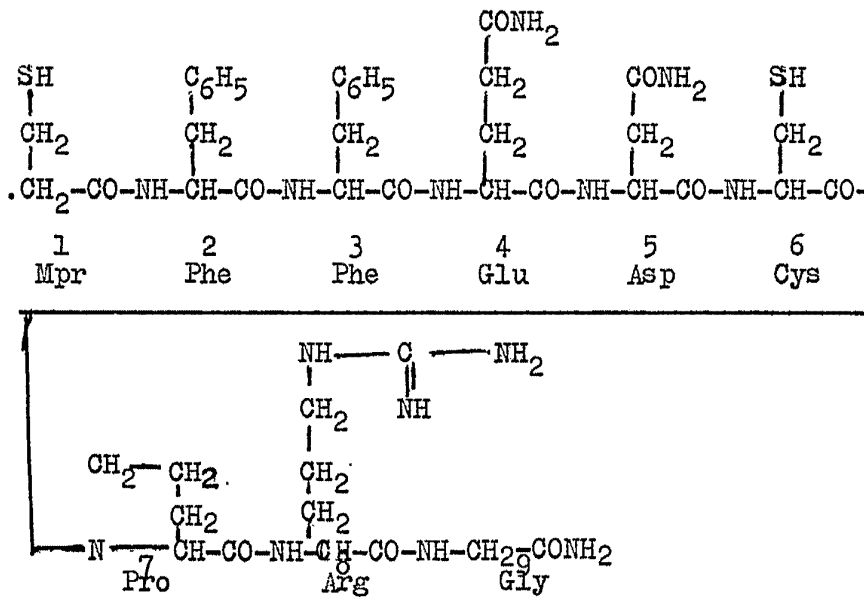


I

y sus sales de adición de ácido.

La presente invención proporciona además un procedimiento para la producción del compuesto I y sus sales de adición de ácido, caracteri-

5. zado porque se oxida un polipéptido de fórmula V,



V



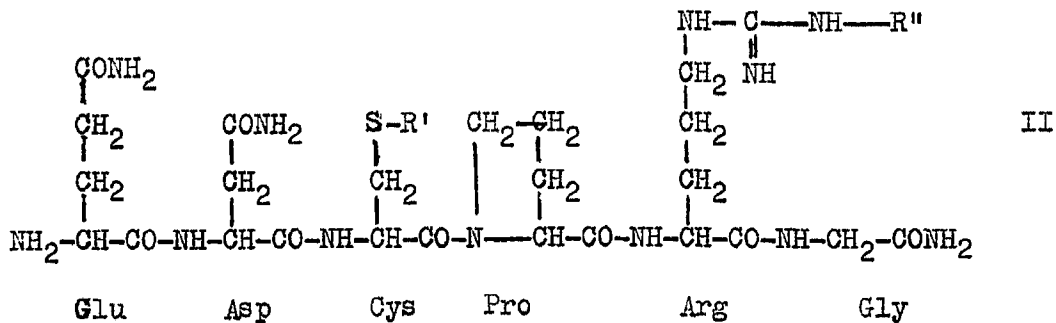


en la que R' significa un radical capaz de proteger un radical sulfhidrilo en la síntesis de los péptidos, y R'' significa un radical capaz de proteger un radical guanido en la síntesis de los péptidos.

5. El derivado octapéptido IV puede obtenerse por métodos conocidos para la síntesis de los polipéptidos, siendo posible unir entre sí los amino-ácidos y el ácido  $\gamma$ -mercaptopropiónico en el orden indicado en la fórmula general IV uno a la vez
10. o formando primero unidades de péptido elementales y uniendo éstas entre sí.

La expresión "métodos conocidos" tal como se usa aquí designa métodos en uso o descritos en la literatura sobre el asunto.

15. El derivado octapéptido IV puede, por ejemplo, ser producido condensando un derivado hexapéptido de fórmula general II,

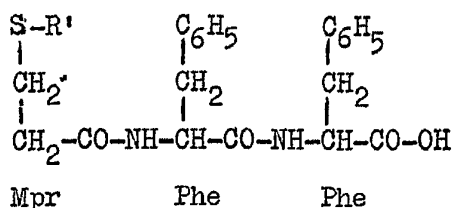


en la que R' y R'' tienen los significados arriba indicados, con un derivado reactivo de un ácido libre

20. de fórmula general III,

325472

- 5 -



III

-Mpr- =  $\beta$ -mercapto-propionil-

en la que R' tiene el significado arriba indicado.

- Ejemplos de radicales para proteger el radical sulfhidrilo en el procedimiento arriba indicado mediante su bloqueo temporal son los radicales bencilo o p-xililo, mientras que ejemplos de radicales para proteger el radical guanido son los radicales p-toluenosulfonilo o bencenosulfonilo.

- Debe tenerse presente que el derivado octapéptido IV no tiene que ser producido en la manera arriba descrita, sino que también puede ser producido mediante la condensación de dos polipéptidos que no sean los arriba indicados (o un polipéptido y un amino-ácido) en la forma de sus derivados protegidos, o un octapéptido y ácido  $\beta$ -mercapto-propiónico en la forma de sus derivados protegidos.

- Los materiales iniciales para la producción del derivado octapéptido IV, en cuanto sean desconocidos, se producen por métodos conocidos para la síntesis de los péptidos, siendo posible unir entre sí los amino-ácidos y el ácido  $\beta$ -mercaptopropiónico uno a la vez o formando primero unidades de péptido elementales y uniendo éstas entre sí.

El compuesto I, que puede ser de-





- rético al ser comparado con el efecto presórico, por lo tanto, es más selectivo en el compuesto I que en la vasopresina arginínica natural. Debido a esta propiedad el uso del compuesto I está especialmente
5. indicado en el tratamiento de Diabetes insipidus.

Compuesto	Efecto antidiurético en UI/mg	Efecto presórico en UI/mg	Relación de los efectos (selectividad)
De-amino <sup>1</sup> -Phe <sup>2</sup> -Arg <sup>8</sup> -vasopresina (compuesto I)	800 ± 170	29 ± 7	27.5
Arg <sup>8</sup> -vasopresina	400	400	1
De-amino <sup>1</sup> -Arg <sup>8</sup> -vasopresina	1300 ± 200	370 ± 20	3.5
Phe <sup>2</sup> -Arg <sup>8</sup> -vasopresina	350	122 ± 13	2.9

- El efecto antidiurético selectivo del compuesto I no pudo ser previsto de las relaciones hasta ahora conocidas entre la estructura química y la actividad biológica de los compuestos con estructura similar, ya que la eliminación del radical amino libre en la posición 1 (de-amino<sup>1</sup>-Arg<sup>8</sup>-vasopresina) y del radical hidroxifenólico en la posición 2 (Phe<sup>2</sup>-Arg<sup>8</sup>-vasopresina) no aumentó substancialmente la selectividad.
- 10.
15. La dosificación del compuesto I debe ser adaptada al grado individual de deficiencia hormonal, la que puede variar considerablemente y puede fluctuar de 0.1 a 5 UI aplicadas 3 a 4 veces -



por día subcutáneamente o intramuscularmente.

El polipéptido del invento puede ser usado en la forma de una base libre o sal de un ácido orgánico o inorgánico o un polímero conteniendo un radical ácido (por ejemplo ácido algínico, celulosa carboximetílica, ácido tánico) ya sea por sí mismo como producto farmacéutico o en forma de preparaciones medicinales adecuadas, por ejemplo para aplicación oral, parentérica, entérica o intranasal. Con el fin de producir preparaciones medicinales adecuadas se trabajan los compuestos con adyuvantes orgánicos o inorgánicos que sean inertes y fisiológicamente aceptables. Los siguientes son ejemplos de tales adyuvantes:

15. Para tabletas : lactosa, almidón, talco y ácido estearico;
- Para soluciones inyectables : agua, alcoholes, glicerina y aceites vegetales;
- Para supositorios : aceites naturales o endurecidos y ceras;
20. para sprays intranasales: : agua, glicerina y otras sustancias líquidas toleradas por la membrana mucosa.

Las preparaciones pueden además contener adecuados agentes de conservación, estabilización y humectación, facilitadores de la solución, substancias edulcorantes y colorantes y aromatizantes.

En los siguientes Ejemplos no limitativos todas las temperaturas están indicadas en grados Centígrado.

30.

325472

- 9 -



EJEMPLO 1: Polipéptido I.

a) S-bencil-β-mercaptopropiónato de  
2,4,5-tricloro-fenilo

5. Se disuelven 20 g de ácido S-bencil-β-mercaptopropiónico y 22 g de 2,4,5-triclorofenol en 170 cc de acetato etílico y 20 cc de acetonitrilo, se enfría a -10° y luego se añaden 21 g de carbodiimida dicitclohexil. Se sacude la solución durante 4 horas a la temperatura ambiente, se filtra la precipitación de dicitclohexil urea con succión y se evapora el filtrado en un vacío a 30°. Se disuelve el residuo en acetato etílico y se lava la solución con bicarbonato sódico acuoso y luego con agua. Después de secar sobre sulfato sódico se evapora el acetato etílico. Se deja reposar el residuo a -10°, con lo cual cristaliza el S-bencil-β-mercaptopropiónato de 2,4,5-tricloro-fenilo con un P.F. de 17°.

10. b) Ester metílico de N-carbobenzoxi-L-fenilalanil-L-fenilalanina

15. Se añaden 47 g de éster metílico de L-fenilalanina en 200 cc de dimetil formamida a 122 g de éster 2,4,5-tricloro-fenílico de N-carbobenzoxi-L-fenilalanina. Después de 16 horas se diluye con 1200 cc de acetato etílico. Se lava la solución con ácido clorhídrico normal, bicarbonato sódico acuoso y agua. Después de secar sobre sulfato sódico, de evaporar el acetato etílico y recrystalizar el residuo de cloroformo/éter, se obtiene el éster metílico de N-carbobenzoxi-L-fenilalanina con un P.F. de 149°.

20. 25. 30.



$[\alpha]_D^{22} = -18^\circ$  (dimetil formamida).

c) S-bencil- $\beta$ -mercaptopropionato de metilo-L-fenilalanil-L-fenilalanina.

5. Se disuelven 74 g de éster metílico de N-carbobenzoxi-L-fenilalanil-L-fenilalanina en 400 cc de ácido acético anhidro que ha sido saturado con bromuro de hidrógeno. Se deja reposar la solución durante una hora a  $20^\circ$ , se evapora en un vacío por debajo de  $40^\circ$  y se lava cuidadosamente el residuo con dietil éter. Seguidamente se disuelve el residuo en 360 cc de agua a  $0^\circ$ , se añaden 22 g de carbonato potásico y se extrae con acetato etílico a  $0^\circ$ . Después de secar sobre sulfato sódico, se añaden 55 g de S-bencil- $\beta$ -mercaptopropionato de 2,4,5-tricloro-fenilo y se deja reposar la mezcla durante 15 horas a  $20^\circ$ . Se lava la solución con ácido clorhídrico diluido y carbonato sódico acuoso, se seca sobre sulfato sódico y se evapora el acetato etílico en un vacío a  $30^\circ$ . Se lava el residuo con éter/éter de petróleo (1:2). Después de secar en un alto vacío a  $40^\circ$  se obtiene el éster metílico de S-bencil- $\beta$ -mercaptopropionil-L-fenilalanil-L-fenilalanina con un P.F. de  $-135^\circ$ ,  $[\alpha]_D^{23} = -21^\circ$  (dimetil formamida).

25. d) Hidrazida de S-bencil- $\beta$ -mercaptopropionil-L-fenilalanil-L-fenilalanina.

30. Se disuelven 52 g de éster metílico de S-bencil- $\beta$ -mercaptopropionil-L-fenilalanil-L-fenilalanina en 260 cc de metanol anhidro, se añaden 32 cc de hidrazina anhidra y se deja reposar la mezcla durante 15 horas a  $20^\circ$ . Se filtra el precipita-

325472

- 11 -



- do con succión y se lava con metanol. Después de se-  
car en un vacío a 50°, se obtiene la hidrazina de S-  
bencil- $\beta$ -mercaptopropionil-L-fenilalanil-L-fenilalanina con un P.F. de 229°,  $[\alpha]_D^{22} = -27^\circ$  (HCl 0.3 N en ácido acético al 95%).
5. e) S-bencil- $\beta$ -mercaptopropionil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-glutaminil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-G-tosil-L-arginil-glicinamida.
10. Se disuelven 31 g de hidrazina de S-bencil- $\beta$ -mercaptopropionil-L-fenilalanil-L-fenilalanina en una mezcla de 250 cc de dimetil formamida, - 250 cc de isopropanol y 32 cc de ácido clorhídrico - 6 N, se enfría a -5° y se añaden 12,5 cc de una solución 5 N de nitrito sódico en agua mientras se agita.
15. Después de 5 minutos se vierte la solución resultante en 1,6 litros de solución 0,25 N de carbonato sódico en agua. Se filtra el precipitado resultante - con succión, se lava con agua, se seca en un alto vacío a 2° y se añade una solución de 50 g de L-glutaminil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-G-tosil-L-arginil-glicinamida en 300 cc de dimetil formamida. Se deja reposar la mezcla durante 2 días, se añaden seguidamente 1200 cc de acetato etílico y se lava el precipitado con acetato etílico. Después de secar a 30° se
20. lava el producto con metanol caliente. Se obtiene la S-bencil- $\beta$ -mercapto-propionil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-glutaminil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-G-tosil-L-arginil-glicinamida con un P.F. de 224°,  $[\alpha]_D^{22} = -37^\circ$  (dimetil formamida).
- 25.
- 30.



f)  $\beta$ -mercaptopropionil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-glutaminil-L-asparaginil-L-cisteinil-L-prolil-L-arginil-glicinamida.

- Se añade la cantidad necesaria de
5. sodio metálico o de potasio metálico a una solución de 5 g de S-bencil- $\beta$ -mercaptopropionil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-glutaminil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-G-tosil-L-arginil-glicinamida en 1200 cc de amoníaco líquido seco para dar una coloración azul estable. Después de añadir 1,5 g de cloro amónico se evapora la solución hasta sequedad. El
10. residuo contiene la  $\beta$ -mercaptopropionil-L-fenilalanil-L-fenilalanil-L-glutaminil-L-asparaginil-L-cisteinil-L-prolil-L-arginil-glicinamida y puede seguirse
15. trabajando como tal.
- g) Compuesto polipéptido I.

- Se disuelve el residuo obtenido en la sección f) que antecede en 4 litros de ácido acético 0,01 N y se oxida a un valor pH de 6,5-9,0 mediante la adición de 7,5 cc de una solución normal de peróxido de hidrógeno en agua. Se ajusta el pH de la solución a 4,5 mediante la adición de ácido clorhídrico diluido y después de la adición de 50 g
20. de cloruro sódico o 0,34 g de ácido metanosulfónico o 0,406 g de ácido trifluoroacético, se evapora hasta sequedad, con lo cual se obtiene un polvo seco que se conserva bien. Este puede ser almacenado y al ser
25. utilizado puede ser disuelto para dar una solución clara. Sin embargo, la solución también puede usar-
- 30.

325472

- 13 -



se como tal, si se desea después de diluirla con -  
agua o una solución salina.

5. Con el fin de separar las sales inorgánicas, el polvo arriba mencionado obtenido después de la adición de ácido trifluoroacético puede ser sometido a una distribución a contracorriente en el sistema butanol secundario/agua/ácido acético glacial 120:160:1. Después de 200 etapas de transferencia la substancia se halla presente en los tubos 50
10. a 80 con un máximo en el tubo 64 ( $K = 0,47$ ). Después de la evaporación se obtiene el polipéptido activo con un buen rendimiento en la forma de un acetato higroscópico, el que demuestra un comportamiento uniforme en la cromatografía y en la electrofóresis. Migración en la electrofóresis sobre papel a un pH de 5,8 y 40 V/cm: 24 mm en 60 minutos (la histidina usada como norma migra 55 mm). Migración en la electrofóresis sobre papel a un pH de 1,9 y 40 V/cm: 38 mm en -
15. 60 minutos (el triptófano usado como norma migra 72 mm). Rf en la cromatografía sobre papel en el sistema alcohol isoamílico/piridina/agua 35:35:30: 0,42. La hidrólisis total (16 horas, 110°, HCl 6 N) proporciona dos equivalentes de fenilalanina y un equivalente de cada uno de los siguientes amino-ácidos: -
20. ácido glutamínico, ácido asparagínico, prolina, arginina y glicina, y los diferentes disulfuros de cisteína y del ácido  $\beta$ -mercaptopropiónico.
- 25.

#### EJEMPLO 2

30. Se usa el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, excepto que se efectúa la oxi



dación final a 0-35° mediante la adición de 7,50 cc -  
de una solución normal de ferricianuro de potasio en  
agua a un pH de 5,0-9,0.

EJEMPLO 3

5. Se usa el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 1, excepto que se efectúa la oxidación final a 0-35° mediante la adición de 1,05 cc de 1,2-diiodo-etano disuelto en acetano, a un pH de 5,5-8,5. Después de la oxidación se extrae el exceso de 1,2-diiodo-etano con acetato etílico. El acetato etílico que queda en la solución acuosa se elimina en un vacío a 20°.

N O T A

15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Suiza con fecha 15 de Abril de 1.965, bajo el número 5 297/65, acogándose por 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 sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE DE-AMINO<sup>1</sup>-PHE<sup>2</sup>-ARG<sup>8</sup>-VASOPRESINA"; caracterizándose por lo siguiente:

30. 1ª.- Procedimiento para la obtención de de-amino<sup>1</sup>-Phe<sup>2</sup>-Arg<sup>8</sup>-vasopresina de fórmula I,

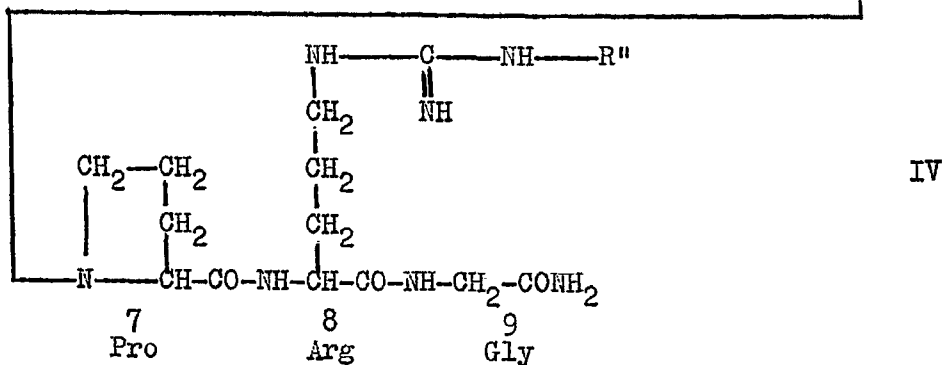
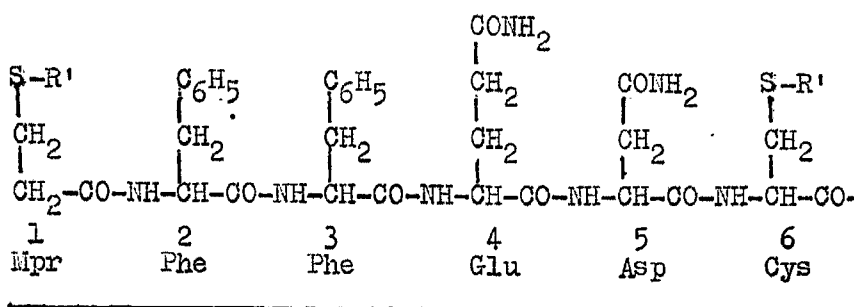




en solución acuosa o solución acuosa orgánica a un pH comprendido entre 4 y 9.

- 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se efectúa la oxidación con aire, oxígeno, peróxido de hidrógeno, ferricianuro de potasio o 1,2-diiodo-etano.
- 5.

- 3ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque se obtiene el polipéptido de fórmula V indicada en la reivindicación 1, por disociación de los radicales protectores R' y R'' en una o más etapas de un derivado octapéptido de fórmula general IV,
- 10.



- en la que R' significa un radical capaz de proteger un radical sulfhidrilo en la síntesis de los péptidos, y R'' significa un radical capaz de proteger un radical guanido en la síntesis de los péptidos.
- 15.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque R' significa el



325472

- 18 - 13



Esta Memoria consta de dieciocho  
hojas, escritas a máquina por una sola cara.

13 ABR. 1966

Madrid,

SANDOZ, A.G.,

J. GOMEZ ACEBO Y MODET  
p. p. F. Hernández Ruiz