

333220



PATENTE DE INVENCIÓN

Case 5807/1+2.

## *Memoria Descriptiva*

*sobre:*

"Procedimiento para la preparación  
de péptidos de efecto ACTH."

*Solicitante:* CIBA SOCIETE ANONYME, entidad suiza,  
residente en: BASILEA, Suiza.

=====

El objeto de la invención son péptidos en los cuales los restos arginilo en las posiciones 17 y 18 de los péptidos con efecto ACTH con 18 - 24 restos de ácido aminico están sustituidos por restos de lisina, así como las sales de adición de ácido, los

5.



derivados y los complejos de metal, especialmente los complejos de cinc, de los mencionados péptidos y un procedimiento para su preparación.

- Entre los mencionados péptidos de actividad ACTH
5. se encuentran también aquellos en los cuales distintos aminoácidos de la secuencia natural están intercambiados por otros aminoácidos, por ejemplo, el primer aminoácido, la serina, por glicina, ó el segundo aminoácido, la tirosina, por fenilalanina, ó el cuarto aminoácido, la metionina, por
10. novalina, leucina ó ácido  $\alpha$  -aminobutírico, ó el quinto aminoácido, el ácido glutamínico, por glutamina, así como las secuencias en las cuales falta el primer aminoácido, la serina.

- Se ha descubierto que los péptidos mencionados,
15. en los cuales los dos restos de arginina en la posición 17 y 18 están sustituidos por restos de lisina muestran asimismo un efecto adrenocorticotrópico muy fuerte, comparados con los péptidos que contienen Arg<sup>17</sup>, Arg<sup>18</sup> tienen sin embargo la ventaja de que son más fáciles de sintetizar y se obtienen en mejor rendimiento. A éste respecto son de destacar especialmente el tetracosapéptido
20. L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-glicil-L-lisil-L-propil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-
25. propil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolin así como el compuesto correspondiente que en lugar del resto glutamínico muestra el resto glutamina, así como las sales de adición de ácido, los derivados y los complejos de éstos tetracosapéptidos.

30. Como sales de adición de ácido son de mencionar



especialmente las sales de los ácidos de aplicación terapéutica, tales como el ácido clorhídrico, el ácido acético, ante todo sin embargo las sales de difícil solubilidad, tales como los sulfatos, fosfatos ó sulfonatos.

5. Bajo derivados se han de entender por ejemplo los ésteres, tales como los ésteres de alquilo inferior, por ejemplo el éster de metilo, etilo, propilo, terc.butilo, ó los ésteres bencílicos sin sustituir ó sustituidos por ejemplo, por el radical nitro, por átomos de halógeno, por radicales de alquilo inferior ó alcoxi inferior, además las hidrazidas y las amidas, especialmente las peptidamidas en las cuales el radical carboxilo que termina en carbono está amidada.

10. Bajos complejos se han de entender los compuestos en forma de complejos aún no aclarados en su estructura, que al agregar ciertos materiales orgánicos ó inorgánicos forman péptidos de actividad adrenocorticotrópica, y ante todo aquellos que les dán un efecto prolongado. Tales compuestos inorgánicos, que se derivan de metales, tales como calcio, magnesio, aluminio, cobalto y especialmente zinc, ante todo las sales de difícil solubilidad, tales como los fosfatos y pirofosfatos así como los hidróxidos de éstos metales.

15. Los materiales orgánicos que producen una prolongación del efecto, son por ejemplo las gelatinas no antígenas, por ejemplo, las oxipoligelatinas, la polivinilpirrolidona y la carboximetil celulosa, además el éster del ácido sulfónico ó fosfórico del ácido alginico, dextrina, polifenoles y polialcoholes, ante todo el polifloretilfosfato y el ácido fitínico, así como los po-



límeros o copolímeros de aminoácidos, por ejemplo, la protamina y especialmente de aminoácidos que muestran una parte preponderante en  $\alpha$ -aminoácidos ácidos, tales como ácido glutamínico ó ácido asparagínico.

5. Los nuevos compuestos tienen un elevado efecto adrenocorticotrópico y lipolítico y se han de emplear en la medicina humana y veterinaria en forma correspondiente, por ejemplo, en lugar de la hormona natural.

10. Los nuevos péptidos se preparan según los métodos conocidos para la preparación de péptidos con gran longitud de cadena. Aquí se ligan los aminoácidos en la secuencia mencionada individualmente ó después de haber formado previamente unidades de péptidos más pequeñas. Al final de la síntesis se disocian los grupos protectores en una sola ó en caso dado en varias etapas.

15. El procedimiento según la presente invención se caracteriza por lo tanto porque de los péptidos de actividad ACTH con 18 - 24 restos de aminoácidos contando a partir del final amínico del ACTH, en los cuales los restos de arginina en las posiciones 17 y 18 están sustituidos por restos de lisina y en los cuales están protegidos por lo menos el radical  $\alpha$ -amino y los radicales amino de las cadenas laterales, así como el radical carboxilo terminal y un radical carboxilo de cadena lateral eventualmente existente, se disocian los radicales protectores, y, si se desea, los compuestos obtenidos se transforman en sus sales de adición de ácido, derivados ó complejos. En enlace de las unidades aminoácido y/o de péptidos se efectúa haciendo reaccionar un aminoácido ó un péptido con radical

20.

25.

30.  $\alpha$ -amino protegido y radical carboxilo terminal activado,



- con un aminoácido ó un péptido con radical  $\alpha$ -amino libre y radical carboxilo terminal libre ó protegido, por ejemplo, esterificado ó amidado, ó porque un aminoácido ó un péptido con radical  $\alpha$ -amino activado y radical carboxilo terminal protegido se hace reaccionar con un aminoácido ó un péptido con radical carboxilo terminal libre y radical  $\alpha$ -amino protegido. El radical carboxilo se puede activar por ejemplo, mediante transformación en un haluro, azida, anhídrido, imidazoluro, isoxazoluro de ácido ó en un éster activado, tal como éster cianmetílico, éster carboximetílico, éster p-nitrofenílico, ó mediante reacción mediante un carbodiimida ( en caso dado bajo adición de N-hidroxi-succinimida) ó N,N'-carbonil-diimidazol, el radical amino se puede activar por ejemplo mediante reacción con un fosfitamida. Como métodos más usuales son de mencionar el método de carbodiimida, el método de azida, el método del éster activado y el método de anhídrido. También es de destacar la así llamada síntesis de vehiculo de material sólido, en la cual el péptido se sintetiza desde el extremo del carboxilo, que está ligado a un polímero en forma de éster, uniendo por condensación consecutivamente los aminoácidos.

- Los radicales funcionales libres, que no participan en la reacción se protegen en forma conveniente, especialmente mediante éstos fácilmente dissociables por hidrólisis ó reducción, el radical carboxilo preferentemente por esterificación, por ejemplo, con metanol, terc.butanol, alcohol bencílico, alcohol p-nitrobencílico, ó formación de amida, el radical amino por ejemplo mediante introducción del radical tosilo, tritilo, formilo, trifluo-



- acetilo, ó -nitrofenilsulfenilo, ftalilo ó carbobenzoxi ó grupos protectores colorantes, tales como el radical p-fenilazo-benciloxi-carbonilo ó el radical p-(p'-metoxi fenilazo)-benciloxicarbonilo, ó especialmente el resto
5. terc.butiloxicarbonilo. Para la protección del radical amino en la agrupación guanido de la arginina es adecuado el radical nitro; el mencionado radical amino de la arginina sin embargo no debe ser necesariamente protegido durante la reacción. El radical imino de la histidina se puede proteger mediante el resto bencilo ó tritilo.
- 10.

- La transformación de un radical amino ó imino protegido en un radical libre así como la transformación de un radical carboxilo funcionalmente modificado en un radical carboxilo libre en el transcurso del procedimiento se efectúa según métodos en sí conocidos mediante tratamiento con agentes hidrolizantes ó bien reductores.
- 15.

- Para la preparación del tetracosapéptido arriba mencionado se puede condensar por ejemplo el decapeptido de fórmula L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutamil-(ó L-glutaminil)-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-glicina, en el cual está protegido el radical  $\alpha$ -amino del seril y en caso dado el radical  $\beta$ -carboxil del glutamil, con el tetradecapéptido de fórmula L-lisil-L-propil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-propil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina, en el cual están protegidos los radicales amino de las cadenas laterales de los restos de lisina, y del derivado tetracosapéptido obtenido se disocian los grupos
- 20.
- 25.
30. protectores. En ésta condensación se emplea como método



- de copulación preferentemente en método de carbodiimida ó el método de los ésteres activados, ante todo mediante el éster p-nitrofenílico. En éste último caso no es necesario aislar el éster p-nitrofenílico del decapeptido como tal, sino que también se pueden formar en la etapa de condensación del decapeptido con radical carboxilo libre, p-nitrofenol y diciohexilcarbodiimida. El decapeptido se encuentra presente por lo tanto como péptido  $\alpha$ -amino protegido con radical carboxilo libre ó con un radical de éster p-nitrofenilo. Como grupos protectores para el radical  $\alpha$ -amino de la serina y los radicales amino de las cadenas laterales de los restos de lisina se emplea preferentemente en radical terc.butiloxicarbonilo; el radical  $\gamma$ -carboxilo del ácido glutámico y el radical carboxilo final de la prolina se protegen ventajosamente por el radical terc.butiléster. Todos éstos grupos protectores se pueden disociar simultáneamente mediante hidrólisis ácida, por ejemplo, con ácido trifluoroacético. El decapeptido mencionado se puede preparar por ejemplo según los procedimientos descritos en las Solicitudes G.Nr. 6400/60, G.Nr. 2206/63 ó G.Nr. 2207/63 suizas.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

- En lugar del éster prolin-terc.butilico se puede emplear en el procedimiento de arriba igualmente la prolinamida; en éste caso se obtiene la tetracosapeptidamida. Empleando otro éster de alquilo inferior ó éster bencílico en lugar del éster terc.butilico de la prolina se obtienen los correspondientes ésteres alquilo inferior ó bencílico del tetracosapéptido. El éster metílico se puede transformar en forma conocida mediante hidrato de hidrazina en la hidrazida.
- 25.
- 30.



La tetracosapeptidohidrazida se puede obtener también mediante condensación del mencionado decapeptido, en el cual el radical  $\alpha$  -amino de la serina está protegido por el radical terc.butiloxicarbonilo y en caso

5. dado el radical  $\gamma$  -carboxilo del ácido glutamínico por el radical éster terc.butilico, con el éster p-fenilazobencílico del mencionado tetradecapeptido, en el cual los radicales amino de las cadenas laterales de los restos de lisina están protegidos por el resto ftalílico, disociación de los radicales amino protectores y del radical éster terc.butilico con ácido, por ejemplo, ácido trifluoracético, y transformación del éster p-fenilazobencílico del tetracosapeptido en la hidrazida mediante monoacetato de hidrazina.
- 10.

15. El mencionado derivado de tetrapéptido se obtiene por ejemplo mediante condensación de éster  $N^{\epsilon}$ -ftalil-L-lisil- $N^{\delta}$ -ftalil-L-lisil- $N^{\delta}$ -ftalil-L-lisil- $N^{\delta}$ -ftalil-L-lisil- $N^{\epsilon}$ -ftalil-L-lisil-L-valil-L-valil-L-tirosil-L-prolil-p-fenilazobencílico (obtenido en forma análoga al derivado decapeptídico en la Solicitud Suiza G.Nr. 10599/61 bajo sustitución de BOC-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH por BOC-Lys(Pht)-OH con BOC-L-valil-glicina en presencia de isobutilclorocarbonato, disociación del radical BOC con ácido trifluoracético, condensación del éster dodecapeptídico con BOC- $N^{\epsilon}$ -ftalil-L-lisil-L-prolina en presencia de isobutilclorocarbonato y disociación del radical BOC del tetradecapeptido con ácido trifluoracético.
- 20.
- 25.

30. Según otro procedimiento para la preparación de tetracosapeptido se puede condensar el tetrapéptido



- L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionina, en el cual está protegido el radical -amino, por ejemplo por el radical terc.butiloxycarbonilo, con el eicosapéptido L-glutamil-(ó glutaminil)-L-histidil-L-fenil lanil-L-arginil-L-triptofil-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-prolina, en el cual están protegidos los radicales amino de las cadenas laterales de los restos de lisina, por ejemplo mediante el radical terc.butil-oxycarbonilo, y en el cual en caso dado el radical -carboxilo del ácido glutamínico está esterilizado, por ejemplo, por el radical éster terc.butilo, preferentemente según el método azida.
- 5.
- 10.

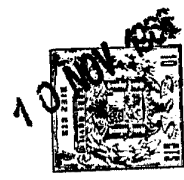
- La invención se refiere también a aquellas formas de ejecución del procedimiento en las cuales se parte de un compuesto que se obtiene como producto intermedio en cualquier etapa del procedimiento y se efectúan las etapas del procedimiento que faltan ó, el procedimiento se interrumpe en cualquier etapa, así como a los productos intermedios que así se obtienen.
- 15.
- 20.

- Según el método de trabajo se obtienen los nuevos compuestos en forma de bases ó de sus sales. De las sales se pueden obtener las bases en forma en sí conocida. De éstas últimas, a su vez, se pueden obtener las sales mediante reacción con ácidos que sirven para la formación de sales de aplicación terapéutica, tales como por ejemplo, aquellos con ácidos inorgánicos, tales como hidrácidos halogenados, por ejemplo, el ácido clorhídrico ó el ácido bromhídrico, el ácido perclórico ó el ácido tiociánico, los ácidos sulfúrico ó fosfórico, ó los ácidos orgánicos, tales
- 25.
- 30.



- como el ácido fórmico, el ácido acético, el ácido propio  
nico, el ácido glicolíco, el ácido láctico, el ácido pi-  
rúvico, el ácido oxálico, el ácido maloníco, el ácido suc-  
cínico, el ácido maleico, el ácido fumárico, el ácido má-  
5. lico, el ácido tartárico, el ácido cítrico, el ácido es-  
rúrbico, el ácido hidroximaleico, el ácido dihidroximalei-  
co, el ácido benzoíco, el ácido fenilacético, el ácido 4-  
-aminobenzoico, el ácido 4-hidroxibenzoico, el ácido antra-  
nílico, el ácido cináurico, el ácido mandélico, el ácido  
10. salicílico, el ácido 4-amino-salicílico, el ácido 2-feno-  
xibenzoico, el ácido 2-acetoxibenzoico, el ácido metano-  
sulfoníco, el ácido etanosulfoníco, el ácido hidroxietano-  
sulfoníco, el ácido bencenosulfoníco, el ácido p-tolueno-  
sulfoníco, el ácido naftalinsulfoníco ó el ácido sulfaní-  
15. lico.

- Los péptidos obtenidos según el presente procedimiento se  
pueden emplear en forma de preparados farmacéuticos.  
Estos contienen los péptidos en mezcla con un material ex-  
cipiente orgánico ó inorgánico, farmacéutico, adecuado pa-  
20. ra aplicación enteral ó parenteral. Como tal entran en  
consideración aquellos materiales que no reaccionan con  
los polipéptidos, tales como por ejemplo, gelatina, lacto-  
sa, glucosa, sal común, fécula, estearato de magnesio,  
talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma, po-  
25. lialquílen glicoles, vaselina, colesterina y otros exci-  
pientes medicinales conocidos. Los preparados farmacé-  
uticos se pueden presentar por ejemplo, como liofilizados  
ó en forma líquida como soluciones, suspensiones ó emul-  
siones. En caso dado estarán esterilizados y/o conten-  
30. drán adyuvantes, tales como agentes de conservación, esta



bilización, humectación ó emulsión. Asimismo pueden con- tener otros materiales terapéuticamente valiosos.

Así se pueden combinar ante todo también con los aditivos usuales en la terapia ACTH para la prolonga-  
5. ción del efecto, tal como por ejemplo, gelatina, poliflo- retinfosfato, carboximetil celulosa ó los compuestos metá- licos de difícil solubilidad arriba mencionados, especial- mente fosfatos, pirofosfatos ó hidróxidos del zinc.

Para prolongar la eficacia se pueden transfor-  
10. mar los nuevos péptidos en sus complejos con polímeros ó copolímeros de aminoácidos, especialmente aquellos que muestran una parte preponderante de  $\alpha$ -aminoácidos ácidos, tales como el ácido glutamínico ó asparagínico de configu- ración L-, D- ó DL. Los polímeros y los copolímeros men-  
15. cionados muestran en las cadenas laterales radicales car- boxilo libres, mientras que el radical carboxilo terminal es libre ó está funcionalmente modificado, por ejemplo, como radical éster ó como un radical amina sin sustituir ó sustituido por restos de hidrocarburo, ante todo radica-  
20. les de alquilo inferior. El peso molecular de los polí- meros puede encontrarse entre 1000 y 200.000, preferente- mente asciende a 2000 - 15000. Para la obtención de los preparados se emplea preferentemente una sal soluble en agua, fisiológicamente compatible, por ejemplo, la sal só-  
25. dico ó amónica, ó una sal de una base orgánica, tal como trietilamina, procaína, dibencilamina, ú otras bases de nitrógeno terciarias.

Los polímeros son conocidos ó se pueden prepa-  
30. rar según procedimientos conocidos, por ejemplo, según el procedimiento descrito por M. Idelson et al., J. Am.Chem.



- Soc.80, 4631 et seq. (1958). Así se puede por ejemplo, hacer reaccionar el glutaminato de  $\alpha$ -carboxianhídrido-  
-  $\beta$ -bencilo ó éster-terc.butílico en dioxano con amoníaco ó una amina en una proporción molar determinada, por ejemplo, 100:1 (según el grado de polimerización deseado), y terminada la polimerización disociar los grupos protectores, por ejemplo, el radical benciloxi con hidrógeno bromado en ácido acético glacial, el radical terc-butiloxi con ácido trifluoracético. Para preparar polímeros con longitud de cadena definida y unitaria se pueden sintetizar los polímeros también mediante síntesis según los procedimientos conocidos para la química de los péptidos. (método de carbodiimida, método de azida, etc.).
- 5.
- 10.

- La concentración del polímero en los preparados farmacéuticos depende de la solubilidad de la sal correspondiente y de la viscosidad. Los polímeros deberán encontrarse en los preparados en forma disuelta y ser inyectables.
- 15.

- La concentración del péptido adrenocorticotrópicamente activo se selecciona de manera que el preparado muestre por ejemplo por cc 10-50 U.I.
- 20.

La invención se describe en los ejemplos siguientes. Las temperaturas están indicadas en grados centígrados:

- Los sistemas de cromatografía de capa delgada se denominan como sigue:
- 25.

- Sistema 43A: terc.amilalcohol-isopropanol-agua (100:40:10)
- Sistema 45 : sec.butanol-amoníaco al 3 % (100:44)
- Sistema 100: Acetato etílico-piridina-ácido acético glacial-agua (62:21:6:11)
- Sistema 101: n-butanol-piridina-ácido acético glacial-agua (30:20:6:24).
- 30.



EJEMPLO 1.-

1) Z.Lis(BOC)-Lis(BOC).NHNH<sub>2</sub>

5. 10 g de Z.Lis(BOC)-Lis(BOC).OCH<sub>3</sub> (obtenida de Z.Lis-(BOC)-OH + H.Lis(BOC)-OCH<sub>3</sub> mediante dicitolohexilcarbodiimida) se disuelven en 160 ml de metanol y se mezclan con 7,8 ml de hidrato de hidrazina. La solución clara se deja reposar durante 24 horas a 25°C y se concentra por evaporación a aproximadamente 1/3 de su volumen original. Al mezclar con 200 ml de agua se separa un precipitado oleoso que al enfriar y frotar se solidifica y se puede pulverizar. Se filtra en vacío, se lava con agua y el producto en bruto se seca. Recristalizando una vez en metanol-éster acético-éster de petróleo se limpia y muestra entonces un p.f. de 118-119,5°. En placas de capa delgada de gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf:

10.

15.

Rf (43 A) = 0,40

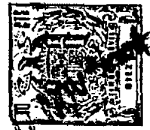
Rf (cloroformo-metanol = 9:1) = 0,75

2) Z.Lis(BOC)-Lis(BOC)-pro-OH

20. 1,87 g. de Z.Lis(BOC)-Lis(BOC).NHNH<sub>2</sub> se disuelven en 15 ml de dimetilformamida recién destilada y se enfrían a -25°. A esto se gotean lentamente a 2,07 ml de solución 4,35N de ácido clorhídrico y a continuación 0,66 ml de solución 5N de nitrito sódico. Se agita durante 10 minutos a -10° y entonces se agrega una solución de 692 mg de L-prolina en 4,2 ml de dimetilformamida-

25. -agua (2:1). Finalmente se gotean aún a -10° 1,82 ml de trietilamina y después se deja reposar la solución de reacción durante la noche a 0° y durante otras 2 horas a temperatura ambiente. Se concentra entonces por evaporación en alto vacío a un volumen de aproximadamente 4 ml

30.



- y el residuo pegajoso se mezcla con 25 ml de agua. Enfriando a 0° y fritando se puede pulverizar. Se filtra en vacío, se lava con poca agua y se seca en alto vacío a 40°. Para limpiar el producto en bruto no cristizable
5. se efectúa una distribución multiplicativa según Craig en el sistema de disolventes metanol-tampón-cloroformo-tetracloruro de carbono (35:13:15:15) /Tampón = 28,5 ml de ácido acético glacial + 19,25 g de acetato amónico en 960 ml de agua/con volúmenes de fases de cada vez 10 ml.
10. Después de 220 estadios se aísla de los elementos de distribución N° 49-73 ( $\mu_{max} = 61$ ;  $K = 0,39$ ) mediante concentración por evaporación hasta secar y eliminación por sublimación del acetato amónico, cromatográficamente, derivado de tripéptido puro, pero amorfo, del p.f. aproximadamente 70-80°.
15. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf:
- |                              |        |
|------------------------------|--------|
| Rf(cloroformo-metanol = 9:1) | = 0,19 |
| Rf(43 A)                     | = 0,29 |
| Rf(45)                       | = 0,52 |
20. 3) Z:Lis(BOC)-Lis(BOC)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir-Pro.OtBu  
2.4 g de Z.Lis(BOC)-Lis(BOC)-Pro.OH y 3,12 g de H.Val-Lis(BOC)-Val-Tir-Pro-OtBu se disuelven en 30 ml de cloroformo absoluto. A 0° se agregan 0,845 g de dicitclohexilcarbodiimida, se agita durante 1 hora a 0° y entonces se deja reposar durante 30 horas a 25°. La dicitclohexilrea cristalina precipitada se separa por filtración y se lava con un poco de éster acético. Al filtrado se agregan 150 ml de éster acético y la fase orgánica se extrae a 0° tres veces, cada una con 30 ml de solución al 3 % de
- 25.
- 30.





- trado se evapora hasta secar. Se obtiene en rendimiento cuantitativo el derivado del octapéptido descarbobenzoxilado, cromatográficamente unitario, en forma de un polvo blanco amorfo del p.f. aproximadamente 110-120°. Este
5. muestra en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice los siguientes valores Rf:
- |                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Rf (43 A)                     | = 0,53 |
| Rf (cloroformo-metanol)= 9:1) | = 0,34 |
- 5) Z.Lis(BOC)-Pro-Val-Gly-Lis(BOC)-Lis(BOC-Lis(BOC)-  
10. Lis(BOC)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir-Pro-OtBu.
- 1,98 g de Z-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC).  
NHNH<sub>2</sub> (Solicitud suiza 2209/63) se disuelven en 22 ml de dimetilformamida absoluta y después de enfriar a -25° se mezcla gota a gota, agitando, con 3,4 ml de solución 2,115-N
15. de ácido clorhídrico y después se mezcla con 0,378 ml de solución 5N de nitrito sódico. La solución clara se sigue agitando durante 15 minutos a -10° y después se mezcla con una solución previamente enfriada a -5° de 1.313 g del derivado del octapéptido arriba descrito en 4 ml de dimetilformamida. Se enjuaga ulteriormente aún con 1 ml de dimetilformamida y entonces se gotean lentamente a -5°
20. 1,05 ml de trietilamina. La mezcla de reacción se sigue agitando aún durante 30 minutos y después se deja reposar durante 15 horas a 0°. Finalmente se concentra hasta,
25. que se forme un aceite viscoso y de éste se precipita mediante adición de 20 ml de agua una masa untuosa.
- Esta se vuelve a disolver bajo calentamiento en 20 ml de metanol y el péptido se vuelve a precipitar mediante adición de 30 ml de agua. Al enfriar a 0° y fritar se obtiene una suspensión pulverulenta que se filtra, selava
- 30.



con agua y se seca. Este producto en bruto se somete para su limpieza a una distribución según Craig en el sistema metanol-tampón-cloroformo-tetracloruro de carbono (60:20:3:60)  $\overline{\Delta}$  Tampón como bajo  $\overline{\Delta}$  con volúmenes de fase de cada vez 20 ml. Después de 218 estadios se aísla de los elementos 105 - 134 ( $u_{max} = 121$ ;  $K = 1,25$ ) mediante concentración por evaporación hasta secar y separación por sublimación del acetato de amonio en alto vacío al tetradecapéptido protegido, cromatográficamente unitario, como un polvo blanco amorfo del p.f. aproximadamente 180-190°. En gel de sílice muestra los siguientes valores Rf:

Rf: (43 A) = 0,80

Rf: (Cloroformo-metanol = 9:1) = 0,49

5. H-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir-Pro-OtBu.

15. 1,66 g de Z.Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir-Pro-OtBu se hidrogenan como es usual en 40 ml de metanol con 300 mg de carbón de paladio (10 % de Pd). Al concentrar la solución de hidrogenación filtrada hasta secar se obtiene directamente el producto cromatográficamente unitario (1,49 g) como polvo amorfo que funde inexactamente a 175-190°. Este muestra sobre gel de sílice los siguientes valores Rf:

Rf (43 A) = 0,41

25. Rf (Cloroformo-metanol = 9:1) = 0,24

7) BOC-Ser-Tir-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Tri-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-His(BOC)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir-Pro-OtBu.

30. 252 mg de BOC.Ser-Tir-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Tri-Gli-OH y 300 mg del éster del tetradecapéptido arriba



- descrito se suspenden en 2,7 ml de piridina absoluta y después de agregar 0,1 ml de agua y 0,213 ml de solución 1N de ácido clorhídrico se disuelve agitando a 50° durante 30 minutos. Se agrega entonces una primera porción de 96
5. mg de dicitclohexilcarbodiimida y después de 3 horas nueva mente una segunda porción igual de grande. Se agita aún du rante otras 3 horas a 50°, se enfría entonces a 0°, se fil tra la dicitclohexil-úrea cristalina precipitada y se enjua ga ulteriormente con 4 porciones de cada una 0,5 ml de pi ridina al 95 %. Del filtrado se precipita el producto en
10. bruto mediante adición de 30 ml de benceno como precipita do en forma de copos, se filtra a 0°, se lava con benceno y éter de petróleo y se seca. El material así obtenido (550 g) se limpia previamente disolviendo y precipitando
15. una vez en metanol-benceno-éter de petróleo y en metanol- agua y para su limpieza definitiva se somete a una distri bución según Craig en el sistema de disolventes metanol- tampón-cloroformo-tetracloruro de carbono (10:3:5:4:) (Tampón = 28,5 ml de ácido acético glacial + 19,25 g de acetato amónico en 960 ml de agua) a través de 240 esta
20. dios con volúmenes de fase de cada vez 10 ml. De los ele mentos de distribución nº 61 - 90 ( $\mu_{max} = 76$ ;  $K = 0,46$ ) se obtiene, al concentrar por evaporación hasta secar y elimi nación por sublimación del acetato amónico en alto vacío
25. 256 mg de acetato del tetracosapéptido protegido puro en forma de un pdvo amorfo del p.f. de aproximadamente 195 - 205° bajo descomposición Sobre gel de sílice muestra los siguientes valores Rf:
- |                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Rf (43 A)                           | = 0,61 |
| Rf (100)                            | = 0,59 |
| 30. Rf (Cloroformo-metanol = 75:25) | = 0,39 |



8) H.Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gli-Lis-  
Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Lis-Lis-Pro-Val-Lis-Val-Tir-  
Pro-OH (Lis 17,18 -  $\beta$  1-24 -corticotropina)

- 200 mg de derivado de tetracosapéptido protegido
5. se disuelven en 4 ml de ácido trifluoroacético al 90 % y se deja reposar durante 1 hora a 22°.
- Se concentra entonces por evaporación a aproximadamente 1 ml, se agregan 10 ml de agua, se vuelve a concentrar por evaporación hasta un volumen de unos 2 ml y se liofiliza.
10. El liofilizado (trifluoroacetato) se filtra para su transformación en el acetato a través de una columna ( $\phi$  = 7,5 mm; l = 18 cm) de intercambiador de iones débilmente básico (por ejemplo, Merck N° II) en forma de acetato. El eluado se concentra por evaporación a aproximadamente
15. 2 ml, se liofiliza y finalmente se seca ulteriormente en alto vacío a 40°. Se obtienen 173 mg de acetato cromatográficamente y electroforéticamente unitario del lis 17,18- $\beta$  1-24-corticotropina como polvo blanco amorfo.

En el cromatograma de capa delgada en óxido de aluminio en el sistema 101 muestra el compuesto un valor Rf de 0,41 ( $\beta$  1-24-corticotropina bajo idénticas condiciones 0,51). En la electroforesis (16 Volt/cm) se traslada a un pH de 6,1 (Tampón de acetato de piridina) en 2 horas 8,4 cm hacia el cátodo.

25. EJEMPLO 2.

Se prepara una ampolla seca de los componentes siguientes:

- |     |   |         |
|-----|---|---------|
|     | Lis 17,18- $\beta$ 1-24 corticotropina- |         |
|     | -hexacetato                             | 0,5 mg  |
| 30. | ZnSO <sub>4</sub> + 7 H <sub>2</sub> O  | 1,23 mg |



	$\text{Na}_3\text{PO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$	1,38 mg
	Mannita	40,0 mg

5. Antes de su empleo se mezcla el contenido del vial seco con 1 ml de agua destilada, contenida en una ampolla de solución. Se obtiene una suspensión con un pH de 7,6.

EJEMPLO 3.

Se prepara una ampolla seca de los componentes siguientes:

10.	Lis 17,18 - $\beta$ 1-24-corticotropina- -hexaacetato	0,5 mg
	$\text{ZnSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$	1,23 mg
	Mannita	40,0 mg

y una ampolla de solución con la siguiente composición de solución:

15.	$\text{Na}_3\text{PO}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$	1,38 mg
	Versena - Fe-3	0,1 mg
	Agua destilada	con 1,0 ml

Antes de su empleo se mezcla el contenido de la ampolla seca y de la ampolla de solución. La suspensión obtenida tiene un pH de 7,6.

20.

EJEMPLO 4.

Se prepara una ampolla de solución de los componentes siguientes:

25.	Lis 17,18 - $\beta$ 1-24-corticotropina- -hexaacetato	0,5 mg
	Gelatina	280,0 mg
	Fenol	5,0 mg
	Agua destilada	con 1,0 ml

EJEMPLO 5.

Una solución esteril, filtrada, acuosa de

30.	Lis 17,18 - $\beta$ 1-24-corticotropina-hexaacetato	se mezcla bajo
-----	---	----------------



condiciones asépticas con polifloretofósforo sódico y cloruro sódico y se llena en viales y se liofiliza de manera que se obtenga un vial seco que contienen los siguientes componentes:

- 5. Lis 17,18-β 1-24-corticotropina-hexaacetato 0,5 mg
- Polifloretofósforo de sodio (al 86,5 %) 23,20 mg
- NaCl 12,28 kg

Antes de su empleo se mezcla al contenido del vial seco con 2 ml de agua destilada contenida en una ampolla de solución.

10.

EJEMPLO 6.

Se prepara una suspensión de los componentes siguientes:

- 15. Lis 17,18-β 1-24-corticotropina-hexaacetato 1,0 mg
- ZnCl<sub>2</sub> 10,5 mg
- Na<sub>2</sub>NPO<sub>4</sub> 1,7 mg
- Alcohol bencílico 17,0 mg
- NaCl 2,5 mg
- 20. NaOH en pH 8,0
- Agua destilada en 2 ml

EJEMPLO 7.

2,0 g de ácido poli-L-glutámico con un peso molecular de aproximadamente 11 000 se disuelven en aproximadamente 5,7 ml de sosa cáustica al 10 %, de manera que el pH de la solución ascienda a 7,4. En esta solución se disuelven 5,0 mg de Lis 17,18-β 1-24-corticotropina-hexaacetato y 0,2 mg de mertiolato y con agua destilada se completa a 10 ml. La solución se filtra en forma esteril. Esta contiene por ml:

25.

30.



- |    |   |        |    |
|----|---|--------|----|
|    | Lis 17,18 - β 1-24-corticotropina-<br>-hexaacetato. | 0,5    | mg |
|    | Acido poli-L-glutaminico                            | 200,-  | mg |
|    | Sosa cáustica hasta un pH de 7,4                    |        |    |
|    | Mertiolato  | 0,02   | mg |
| 5. | Agua destilada                                      | en 1,0 | ml |

EJEMPLO 8.

- 2,0 g de ácido poli-L-glutaminico se disuelven en aproximadamente 5,7 ml de sosa cáustica al 10 % de manera que el pH de la solución ascienda a 7,4. En esta solución se disuelven 5,0 mg. de Lis 17,18 - β 1-24-corticotropina-hexaacetato y 0,2 mg de mertiolato. A esta solución se agrega 1 ml de una solución de clorhídrico de cloruro de cinc (pH 2,8) con 5,2 mg de cloruro de cinc por ml. El pH se ajusta con sosa cáustica a 7,8 y con agua destilada se completa a un volúmen final de 10 ml.

EJEMPLO 9.

- 2,0 g de ácido poli-L-glutaminico se disuelven en aproximadamente 5,7 ml de sosa cáustica al 10 % de manera que el pH de la solución ascienda a 7,4. En esta solución se disuelven 5,0 mg de Lis 17,18 - β 1-24-corticotropina-hexaacetato y 0,2 mg de mertiolato. A esta solución se agregan 1 ml de una solución clorhídrica (pH 2,8) conteniendo 5,2 mg de cloruro de cinc y 0,85 mg de fosfato disódico (anhidro). El pH se ajusta con sosa cáustica a 7,8. Se completa con agua a un volúmen de 10 ml.

EJEMPLO 10.

- Se disuelven 11,12 mg de ácido acético glacial, 1,21 mg de acetato sódico, 2,5 mg de cloruro sódico y 2,0 mg de Lis 17,18 - β 1-24-corticotropina-hexaacetato en 0,7 ml de agua destilada y se completa con agua destilada a 1 ml.



La solución se somete al autoclave durante 20 minutos a 120°. El pH es, después de esterilización, de 3,7.

EJEMPLO 11.

5. Se disuelven en 0,7 ml de solución fisiológica de cloruro sódico 0,5 mg de Lis 17,18-β 1-24-corticotropina-hexaacetato y la solución se acidifica con ácido clorhídrico 0,1 N a un pH de 3,2. Con agua destilada se completa a 1 ml y se esteriliza con calor como en el ejemplo 1.

10. EJEMPLO 12.

En 0,8 ml de agua destilada se disuelven 7,05 ml de glicina y 6,08 mg de cloruro sódico y se agregan 0,055 ml de HCl 0,1 N. A continuación se disuelve 1,0 mg de Lis 17,18-β 1-24-corticotropina-hexaacetato en la solución y se completa con agua destilada a 1,0 ml. La solución se filtra en la forma usual, se llena en ampollas y se somete en el autoclave durante 20 minutos a 120°. El pH asciende a 3,6.

EJEMPLO 13.

20. En 0,8 ml de agua destilada se prepara una solución de 10,16 mg de ácido cítrico (con 1 Mol de agua de cristalización), 0,097 ml de sosa cáustica 1 N, 3,54 mg de cloruro sódico y 0,51 ml de ácido clorhídrico 0,1 N. En esta solución se disuelven 4,0 mg de Lis 17,18-β 1-24-corticotropina-hexaacetato y se completa con agua destilada a 1,0 ml. La solución se filtra en la forma usual, se llena en ampollas y se somete al autoclave durante 20 minutos a 120°. El pH asciende a 3,6.



EJEMPLO 14.

Se prepara una suspensión de los siguientes componentes:

5.	Lis 17,18- $\beta$ 1-24-corticotropina-hexaacetato	1,0	mg
	ZnCl <sub>2</sub>	5,25	mg
	Na HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,05	mg
	NaCl	2,0	mg
	Alcohol bencílico	10,0	mg
	NaOH ad pH 8,3		
10.	Agua destilada	en 1,0	ml

EJEMPLO 15.

Se prepara una suspensión de los componentes siguientes:

15.	Lis 17,18- $\beta$ 1-24-corticotropina-hexaacetato	1,0	mg
	ZnCl <sub>2</sub>	6,30	mg
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,26	mg
	NaCl	1,5	mg
	Alcohol bencílico	10,0	mg
	NaOH ad pH 8,3		
20.	Agua destilada	en 1,0	ml

EJEMPLO 16.

25. Se preparan 0,5 ml de una solución ácido clorhídrica de 0,5 mg de Lis 17,18- $\beta$  1-24-corticotropina-hexaacetato, 5,25 mg de ZnCl<sub>2</sub>, 1,05 mg de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .2H<sub>2</sub>O y 2,0 mg de NaCl del pH 3,0 y la solución se vierte a 0,5 ml de una solución acuosa de 10 mg de alcohol bencílico que contiene tanta sosa cáustica de manera que se obtenga una suspensión del pH 8,3.



EJEMPLO 17.

5. 5 mg de ácido poli-L-glutámico de peso molecular medio de 39 600 se disuelven en 5 ml de solución 0,1 N de sosa cáustica. La solución se filtra, se agrega una solución de 2,5 mg de Lis 17,18-β 1-24-corticotropina-hexaacetato se acidifica entonces con ácido acético ó ácido clorhídrico a un pH de 4 y se completa con agua a 10 ml. Se precipita así en forma finamente dispersa un complejo de ácido poli-L-glutámico-Lis 17,18-β 1-24-corticotropina. La suspensión contiene por ml 0,5 mg de ácido poli-L-glutámico y 0,25 mg de Lis 17,18-β 1-24-corticotropina como compuesto complejo.

EJEMPLO 18.

15. 2,0 g de ácido poli-L-glutámico con un peso molecular medio aproximado de 39 600 se disuelven aproximadamente en 5,7 ml de sosa cáustica al 10 % de manera que el pH de la solución sea de 7,4. En esta solución se disuelven entonces 4,0 mg de Lis 17,18-β 1-24-corticotropina-hexaacetato y 0,2 mg de mertiolato y se completa con agua destilada a 10 ml.

La solución se filtra en forma esteril.

Contiene por ml:

- |     |   |       |    |
|-----|---|-------|----|
| 25. | Lis 17,18-β 1-24-corticotropina-hexaacetato | 4,0   | mg |
|     | Acido poli-L-glutámico                      | 200,0 | mg |
|     | Sosa cáustica hasta un pH de 7,4            |       |    |
|     | Mertiolato                                  | 0,02  | mg |
|     | Agua destilada en                           | 1,0   | ml |



N O T A

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente

5. 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 y números: el 12 de noviembre de 1965, nº 15639/65 y el 18 de octubre

10. de 1966, nº 14997/66, acogándose, 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, sobre: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE PÉPTIDOS DE EFECTO ACTH."; caracterizándose por lo

15. siguiente:

1.- Procedimiento para la preparación de péptidos de efecto ACTH, caracterizado porque de los péptidos de actividad ACTH con 18 - 24 restos de aminoácido contando a partir del final amínico, en los cuales los restos de arginina en las posiciones 17 y 18 están sustituidos por restos de lisina y en los cuales están protegidos por lo menos el radical  $\alpha$ -amino y los radicales amino de las cadenas laterales así como el radical carboxilo terminal

20. y un radical carboxilo de cadena lateral eventualmente existente, se disocian los radicales protectores y, si se desea, los compuestos obtenidos se transforman en sus sales de adición de ácido, derivados ó complejos.

2.- Procedimiento, según la reivindicación 1,

30. caracterizado porque se parte de peptidos en los cuales



el radical  $\alpha$ -amino y los radicales  $\alpha$ -amino están protegidos por el radical terc.butiloxycarbonilo, el radical carboxilo final y el radical  $\gamma$ -carboxilo del ácido glutamínico por el radical terc.butiléster.

5.                   3.- Procedimiento, según la reivindicación 2, caracterizado porque todos los grupos protectores se disocian mediante ácido trifluoracético.
- 4.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 - 3, caracterizado porque se parte de peptidos protegidos en los cuales el primer aminoácido está intercambiado por glicina.
10.                   5.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 - 3, caracterizado porque se parte de peptidos protegidos en los cuales el 1º y 3º aminoácido están intercambiados por glicina.
15.                   6.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 - 5, caracterizado porque se parte de peptidos protegidos en los cuales el 5º aminoácido está intercambiado por glutamina.
20.                   7.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 - 6, caracterizado porque se parte del tetracosapeptido protegido.
- 8.- Procedimiento, según la reivindicación 7, caracterizado porque se parte del tetracosapeptido protegido de fórmula L-seril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofilglicil-L-lisil-L-propil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-propil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina ó del compuesto correspondiente que en lugar del resto glutamílico muestra el resto de la glutamina.
- 25.
- 30.



9.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 - 8, caracterizado porque se preparan los complejos de los péptidos con cinc ó las sales de difícil solubilidad ó los hidróxidos del cinc.

5. 10.- "Procedimiento para la preparación de péptidos de efecto ACTH"; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

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

Madrid, 10 NOV. 1965

CIBA SOCIETE ANONYME,

J. GOMEZ AC ECH Y MOREI

p. p. Firmado: F. Hernández Ruiz