



PATENTE DE INVENCIÓN

Case 6086/1-3.

348731

## *Memoria Descriptiva*

*sobre:*

"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PEPTIDOS CON EFECTO ACTH".

-----

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

-----

En la patente Nr. 316.391 (case 5503/1 - 3/E) se describen unos péptidos que se caracterizan por un efecto ACTH reforzado y que se diferencian de los péptidos conocidos con efecto ACTH debido a que en el extremo amínico, como primer  $\alpha$ -aminoácido, muestran un D-amf



noácido.

Como péptido con muy buen efecto ACTH se describe en la patente principal la H-D-Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-OH (D-Ser<sup>1</sup>- $\beta$ <sup>1-19</sup>-corticotropina).

- 5.
- Se ha descubierto ahora que un amida del octa deca péptido correspondiente que en lugar del resto metionínico en la posición 4 contiene el resto norleucina y en lugar de los restos arginínicos en la posición 17, 18 contiene restos de lisina, tienen un efecto adrenocorticotrópico mejor. El nuevo péptido D-Ser<sup>1</sup>, Nle<sup>4</sup>, Lis<sup>17</sup>, 18- $\beta$ <sup>1-18</sup>-corticotropina-Lis<sup>18</sup>-amida, se puede obtener con mayor facilidad que la D-Ser<sup>1</sup>- $\beta$ <sup>1-19</sup>-corticotropina, ya que no contiene los restos de arginina en las posiciones 17, 18 que, debido al radical guanidino en la cadena lateral, dificultan la obtención del péptido.
- 10.
- 15.

El objeto de la presente invención son por lo tanto la D-Seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptoglicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-lisin-amida, así como el correspondiente compuesto que, en lugar del resto glutamílico, muestra el resto de la glutamina, sus sales de adición de ácido, y complejos, y el procedimiento para su obtención.

- 20.
- 25.
- Como sales de adición de ácido son de mencionar especialmente las sales de los ácidos de aplicación terapéutica, tales como el ácido clorhídrico, acético, pero ante todo las sales de difícil solubilidad, tales como los sulfatos, fosfatos o sulfonatos.
- 30.
- Como ejemplos se han de entender los compues-



- tos en forma de complejos, en su estructura aún no aclarados, que bajo adición de ciertas materias orgánicas o inorgánicas forman péptidos adrenocorticotrópicamente eficaces y ante todo aquellas que les confieren un efecto más prolongado. Tales materias inorgánicas son compuestos derivados de metales, tales como calcio, magnesio, aluminio, cobalto y especialmente del cinc, ante todo, las sales de difícil solubilidad, tal como los fosfatos y pirofosfatos, así como los hidróxidos de estos metales. Materias orgánicas que producen una prolongación del efecto son, por ejemplo, gelatinas no antigénicas, por ejemplo, oxipoligelatinas, polivinilpirrolidona y carboximetilcelulosa, además, el éster del ácido sulfónico o fosfórico del ácido algínico, dextrina, polifenoles y polialcoholes, ante todo fosfato polifloretnico y ácido pitínico, así como los polímeros y copolímeros de aminoácidos, por ejemplo, protamina, y especialmente de aminoácidos que muestran una parte predominante en  $\alpha$ -aminoácidos ácidos, tal como el ácido glutamínico o ácido asparagínico.
- 5.
  - 10.
  - 15.
  - 20.

Los nuevos compuestos poseen, como ya se ha mencionado, una actividad ACTH considerablemente más fuerte que los correspondientes compuestos con configuración L en el primer aminoácido. Por lo tanto, se han de emplear en la medicina humana y veterinaria, por ejemplo, en lugar de la hormona natural.

- 25.

Los nuevos péptidos se obtienen según los métodos conocidos para la fabricación de los péptidos con gran longitud de cadena bajo empleo de D-serina como N-aminoácido terminal. Aquí se ligan los aminoácidos en

- 30.



DIC 1967

la secuencia mencionada individualmente o después de haber formado previamente pequeñas unidades peptídicas. Al final de la síntesis se disocian los grupos protectores en una sola o, en caso dado, en varias etapas.

5. El procedimiento según la presente invención se caracteriza, por lo tanto, porque de la D-Seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil-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-lisin-amida
10. o del correspondiente compuesto, que en lugar del res- to glutámico muestra el resto de la glutamina, en cu- yos péptidos por lo menos el radical  $\alpha$ -amino y los ra- dicales amino de cadena lateral así como un radical car- boxilo de cadena lateral en caso dado existente, están
15. protegidos, los radicales protectores se disocian y, si se desea, los compuestos obtenidos se transforman en sus sales de adición de ácido, o complejos. El enlace de las unidades aminoácido y/o péptido se efectúa haciendo reac- cionar un aminoácido ó un péptido con radical  $\alpha$ -amino
20. protegido y radical carboxilo terminal activado con un aminoácido, o un péptido con radical  $\alpha$ -amino libre y radical carboxilo terminal libre o protegido, por ejem- plo esterificado o amidado, o haciendo reaccionar un aminoácido o un péptido con radical  $\alpha$ -amino activado y
25. radial carboxilo terminal protegido con un aminoácido o un péptido con radical carboxilo terminal libre y ra- dical  $\alpha$ -amino protegido. El radical carboxilo se puede activar, por ejemplo, mediante transformación en un ha- luro, ázida, anhídrido, imidazolido, isoxazolido de aci- do o en un éster activado, tal como éster cianmetílico,
- 30.



éster carboximético, éster p-nitrofenílico, o mediante reacción con un carbodiimida (en caso dado bajo adición de N-hidroxi-succinimida) o N,N'-carbonildiimidazol, el radical amino se puede activar, por ejemplo, mediante reacción con un fosfatamida. Como métodos más usuales son de mencionar el método carbodiimida, el método azida, el método de los ésteres activados y el método anhídrido. También es de destacar la así llamada síntesis de vehículo de producto sólido en la que el péptido se sintetiza desde el extremo carboxilo, que está ligado en forma de éster a un polímero, condensando consecutivamente los aminoácidos.

Los radicales funcionales, libres, que no participan en la reacción, son convenientemente protegidos, especialmente mediante hidrólisis o reducción de restos fácilmente dissociables, el radical carboxilo preferentemente por esterificación, por ejemplo, con metanol, terc. butanol terc., alcohol bencílico, alcohol p-nitrobencílico, el radical amino, por ejemplo mediante introducción del radical tosilo, tritilo, formilo, trifluoracetilo, o-nitrofenilsulfenilo, ftalilo, o carbobenzoxi o grupos protectores de color, tal como el radical p-fenilazobenciloxicarbonílico y el radical p-(p'-metoxifenilazo)-benciloxicarbonílico, o especialmente del resto butilo terc.-oxicarbonílico. Para la protección del radical amino en la agrupación guanido de la arginina es adecuado el grupo nitro; el mencionado radical amino de la arginina, sin embargo, no es necesario proteger durante la reacción. El radical imino de la histidina se puede proteger por el resto bencílico o trietilico.



La transformación de un radical amino o imino protegido en un grupo libre, así como la transformación de un radical carboxilo funcionalmente modificado en un radical carboxilo libre en el transcurso del procedimiento, se puede efectuar según métodos en sí conocidos, mediante tratamiento con medios hidrolizantes o bien reductores.

Un procedimiento preferente consiste en que el tripéptido que contiene los tres primeros 3-aminoácidos, H-D-Ser-Tir-Ser-OH (la forma abreviada de escribir se refiere a L-aminoácidos, si la D no está especialmente mencionada) o el tetrapéptido, que contiene además el 4º aminoácido, se condensa con el heptapéptido o bien hexapéptido de los siguientes aminoácidos hasta el aminoácido 10, preferentemente según el método azídico, y después el decapéptido se condensa con el amida del octapéptido de los aminoácidos 11 - 18. En esta condensación se emplea como método de copulación preferentemente el método carbodiimida o el método de los ésteres activados, ante todo mediante el éster p-nitrofenílico. En este último caso no es necesario aislar el éster p-nitrofenílico del decapéptido como tal, sino que se puede formar también en la etapa de condensación misma del decapéptido con radical carboxilo libre, p-nitrofenol y dicitclohexilcarbodiimida. El decapéptido se encuentra por lo tanto presente como péptido  $\alpha$ -amino-prottegido con radical carboxilo libre o con un radical éster p-nitrofenílico. Los radicales amino de cadenas laterales existentes en las fracciones péptídicas a condensar se protegen preferentemente mediante el radical terc.-buti



lo. oxicarbonílico, el radical carboxilo por el radical éster terciobutilo. Estos radicales protectores se pueden disociar en la última etapa con ácido trifluoroacético.

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

10. Según la forma de trabajo se obtienen los nuevos compuestos en forma de bases o de sus sales. De las sales se pueden obtener en forma conocida las bases. De estas últimas, a su vez, se pueden mediante reacción con ácidos adecuados para la obtención de sales de aplicación terapéutica, obtener sales tales como por ejemplo aquellas con ácidos inorgánicos, tales como los hidrácidos halogenados, por ejemplo el ácido clorhídrico o bromhídrico, el ácido perclórico, el ácido nítrico o tiociánico, el ácido sulfúrico o los ácidos fosfóricos, o con ácidos orgánicos, tales como el ácido fórmico, acético, propiónico, glicólico, láctico, pirogálico, oxálico, malónico, succínico, maléico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, ascorbínico, hidroximaleico, dihidroximaleico, benzoico, fenilacético, 4-aminobenzoico, 4-hidroxibenzoico, antranílico, cinámico, mandélico, salicílico, 4-amino-salicílico, 2-fenoxibenzoico, 2-acetoxibenzoico, metanosulfónico, etanosulfónico, hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, naf
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.



talinsulfónico o sulfenílico.

- Los péptidos abtenidos según este procedimien  
to se pueden emplear en forma de preparados farmacéuti-  
cos. Estos contienen los péptidos en mezcla con material
5. vehículo orgánico o inorgánico, farmacéuticamente ade-  
cuado para la aplicación enteral o parenteral. Como ta-  
les entran aquellos materiales en consideración que no  
reaccionan con los péptidos, tal como por ejemplo,  
gelatina, lactosa, glucosa, sal común, fécula, esteara-  
to de magnesio, talco, aceites vegetales, alcoholes ben-  
10. cíficos, goma, glicoles polialquilénicos, vaselina, co-  
lesterina y otros vehículos medicinales conocidos. Los  
preparados farmacéuticos se pueden presentar por ejem-  
plo, como liofilizados o en forma líquida como solucio-  
15. nes, suspensiones o emulsiones. En caso dado estarán es-  
terilizados y o bien contendrán materias auxiliares, ta-  
les como medios de conservación, estabilización, humec-  
tación o emulsión. Asimismo pueden contener otros mate-  
riales terapéuticamente valiosos.
20. Así se puede por ejemplo combinarlos también  
con los aditivos usuales en la terapia ACTH para la pro-  
longación del efecto, tales como por ejemplo, oxipolige-  
latina, fosfato polifloretnico, celulosa carboximetili-  
ca, o los compuestos metálicos de difícil solubilidad
25. mencionados más arriba, especialmente los fosfatos, pi-  
rofosfatos o hidróxidos de cinc.
- Además se puede, para prolongar la eficacia,  
transformar los nuevos péptidos en sus complejos con po-  
límeros o copolímeros de aminoácidos, especialmente aque-  
30. llos que muestran una parte predominante en  $\alpha$ -aminoáci



- dos ácidos, tales como el ácido glutamínico o asparagínico de la configuración L, D ó D, L. Los polímeros y copolímeros mencionados, muestran en las cadenas laterales radicales carboxilo libres, mientras que el radical carboxilo terminal puede ser libre o funcionalmente modificado, por ejemplo, como radical éster o como radical amídico sin sustituir o sustituido por resto hidrocarburo, ante todo radicales alquilo inferior. El peso molecular de los polimerizados pueden encontrarse entre 10.000 y 100.000, preferentemente entre 20.000 - 80.000. Para la preparación de los preparados se emplea convenientemente una sal soluble en agua, fisiológicamente compatible, por ejemplo, la sal sódica o amónica, o una sal con una base orgánica, tal como trietilamina, procaina dibencilamina y otras bases de nitrógeno terciarias.

- Los polímeros son conocidos o se pueden obtener 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, dejar reaccionar el éster  $\alpha$ -carboxi anhidrido- $\gamma$ -bencílico del ácido glutámico o el éster terc.-butilo en dioxano con amoníaco o una amina en una proporción molecular 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 ácido bromhídrico en ácido acético glacial, el radical terc.-butiloxi con ácido trifluoroacético. Para obtener polímeros con longitud de cadena definida, unitaria, se



pueden sintetizar los polímeros también mediante síntesis según los procedimientos conocidos en la química de los péptidos (método carbodiimídico, azídico, etc.).

5. La concentración del polímero en los preparados farmacéuticos depende de la solubilidad de la sal correspondiente y de la viscosidad. El polímero debe poderse encontrar en los preparados en forma disuelta e inyectable.

10. La invención se describe en los ejemplos siguientes. Las temperaturas se indican en grados centígrados.

Los sistemas de cromatografía de capa delgada se denominan como sigue:

15. Sistema 43A : Terc.-alcohol amílico-isopropanol-agua  
(67:26-7)

Sistema 43C : terc.-amilalcohol-isopropanol-agua  
(51:21:28)

20. Sistema 52 : n-butanol-ácido acético glacial-agua  
(100:10:30)

Sistema 52A : n-butanol-ácido acético glacial-agua  
(67:10:23)

Sistema 100 : acetato etílico-piridina-ácido acético glacial-agua (62:21:6:11)

25. Sistema 101 : n-butanol-piridina-ácido acético glacial-agua (38:24:8:30)

Se emplean las abreviatura siguientes:

Z = carbobenzoxi

BOC = terc.butilooxicarbonilo

30. tBu = terc.-butilo



Ejemplo 1

1) H-Nle-OCH<sub>3</sub>

5. 18,4 g de L-norleucina se suspenden en 57 cc de metanol y agitando se agregan a -15°, en el plazo de 30 minutos, 11 cc de cloruro tionílico. Se agita aún durante otros 30 minutos a -15°, después, cada vez durante 90 minutos, a 0° y a temperatura ambiente. Después de reposar durante 3 horas a 40° se evapora la solución a 35° hasta sequedad y el residuo se recristaliza en acetona-hexano (2:1). P.f. 140-141°.

10. 18,1 g del hidrocioruro se disuelven en 20 cc de agua, se recubre con 200 cc de éter y a 0° se mezcla con 40 cc de solución saturada de carbonato potásico fría. La fase acuosa se extrae varias veces con éter, se reúnen las soluciones etéreas, se secan sobre sulfato sódico y se evapora en alto vacío a 0°. El éter libre se obtiene en forma de un aceite claro.

2) BOC-Ser-Nle-OCH<sub>3</sub>

20. Una solución de 22,3 g de hidrato de BOC-L-serina en 270 cc de acetonitrilo se mezcla con una solución de 14,3 g de éster L-norleucinmetílico en 65 cc de acetonitrilo. Se enfría a -5°, se agregan 22,7 g de dicitclohexilcarbodiimida en 35 cc de acetonitrilo, se agita aún durante una hora a -5°, después durante la noche a 0°, se libera de la dicitclohexilúrea y la solución se evapora a 35°. El residuo se recoge en éster acético, la solución se lava con ácido N-clorhídrico, N-bicarbonato sódico y solución saturada de cloruro sódico, y se evapora. El éster del dipéptido cristalino funde a 69-71°.

30. 3) H-Ser-Nle-OCH<sub>3</sub>



28,0 g de BOC-Ser-Nle-OCH<sub>3</sub> se disuelven en 320 cc de ácido trifluoracético al 90% y se deja durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de concentrar la solución a la mitad de su volumen se mezcla con 500 cc de éter, con lo cual cristaliza el trifluoracetato. Este, (24,2 g) se disuelve en 35 cc de agua, la solución se recubre con 700 cc de cloroformo y agitando se mezcla a 0° con 210 cc de solución saturada de carbonato potásico. De la fase clorofórmica se obtienen 16,1 g de éster de dipéptido cristalino del p.f. 84-85°.

4) BOC Tir-Ser-Nle-OCH<sub>3</sub>

19,6 g de BOC-Tir-OH y 16,1 g de H-Ser-Nle-OCH<sub>3</sub> se disuelven en una mezcla de 350 cc de acetonitrilo y 17,5 cc de dimetilformamida, a -5° se mezcla con una solución de 15,9 g de dicitclohexilcarbodiimida en 175 cc de acetonitrilo y se agita durante 1 hora a -5°, después durante la noche a 0°. Se libera de la dicitclohexilúrea, se lava como arriba indicado y la solución se evapora. El éster de tripéptido protegido funde, después de recrystalizar, a 143-145°.

5) H-Tir-Ser-Nle-OCH<sub>3</sub>

27,3 g del éster de tripéptido protegido se disuelven en 82,5 cc de ácido N-clorhídrico en metanol, se deja reposar durante 2 horas a temperatura ambiente y después se mezcla con 1,5 l de éter. Se obtiene el hidrocioruro del éster de tripéptido libre que, después de recrystalización, funde a 218-220° (descomposición).



5. 14,2 g del hidrocloreuro se disuelven en 20 cc de agua, se recubre con 400 cc de cloroformo y a 0° se mezcla con 100 cc de solución saturada de carbonato potásico. La base libre funde, después de recristalizar, a 84-86°.

6) BOC-D-Ser-Tir-Ser-Nle-OCH<sub>3</sub>

10. 13,4 g de H-Tir-Ser-Nle-OCH<sub>3</sub> se disuelven en 250 cc de acetonitrilo y, después de agregar 15 cc de dimetilformamida, se mezcla con 7,35 g de BOC-D-Serina. A -5° se agrega una solución de 7,45 g de dicitclohexilcarbodiimida en 30 cc de acetonitrilo y se agita entonces durante 1 hora a -5° y durante la noche a 0°. Se libera de la dicitclohexilúrea, la solución se evapora. El éster de tripéptido protegido funde, después de recristalizar, a 149-151° (descomposición).

15. 7) BOC-D-Ser-Tir-Ser-Nle-NH-NH<sub>2</sub>

20. 11,65 g de éster de tripéptido se disuelven en 50 cc de metanol, a la solución se agregan 4,8 cc de hidrato de hidrazina y la mezcla se deja reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. Se agregan 50 cc de agua y se agita hasta que el producto gelatinoso ha terminado de cristalizar totalmente. Este funde a 205-207°.

25. 8) BOC-D-Ser-Tir-Ser-Nle-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Tri-Gli-OH

30. 8,75 g de BOC-D-Ser-Tir-Ser-Nle-NH-NH<sub>2</sub> se disuelven en 75 cc de dimetilformamida y agitando se mezcla a -15° con 20 cc de una solución 2N de ácido clorhídrico en ácido acético glacial. Después de agregar 1,65 g de terc.butilnitrito se agita la solución



- durante 10 minutos a  $-15^{\circ}$  y después se mezcla con 5,5 cc de trietilamina. La solución así obtenida de la BOC-tetrapeptidoazida se vierte, gota a gota, sobre una solución enfriada a  $-10^{\circ}$  de 10 g de H-Glu(OtBu)-
5. -His-Phe-Arg-Tri-Gli-OH en 225 cc de dimetilformamida y 12 cc de agua; la mezcla de reacción se agita durante 20 horas a  $0^{\circ}$  y después se mezcla con 900 cc de agua. El decapeptido amorfo se filtra en vacío y se lava con dimetilformamida-agua (1:5) y acetonitrilo.
10. Después de disolver y precipitar en acetonitrilo acuoso y equilibrar con la humedad del aire se obtienen 12,9 g de decapeptido-tetrahidrato puro protegido del p.f. 215-218 $^{\circ}$  (descomposición);  $[\alpha]_D^{20} = 18$  (c = 0,5 en piridina-agua 1:1). El compuesto es unitario en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice;  $R_F(52) = 0,3$ .
15. 9) BOC-D-Ser-Tir-Ser-Nle-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Tri-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-NH<sub>2</sub>
20. 1 g de BOC-D-Ser-Tir-Ser-Nle-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Tri-Gli-OH y 0,7 g de H-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-NH<sub>2</sub> (véase la pat. esp. 333 219, case 5806/5503/1+2) se suspende en 20 cc de piridina y 0,83 cc de ácido clorhídrico 1N.
25. Se agita durante 15 minutos a  $50^{\circ}$ . Seguidamente se agregan 0,4 g de dicitclohexilcarbodiimida y se agita durante otras 3 horas a  $50^{\circ}$ . Se agrega entonces nuevamente la misma cantidad de carbodiimida y se agita durante otras 3 horas a  $50^{\circ}$ . Después se retira la cantidad principal de la piridina en vacío, el residuo
- 30.



- se mezcla con 30 cc de dimetilformamida caliente, se frota y se filtra de lo insoluble. El filtrado se concentra por evaporación alto vacío a 40°, a un volumen de unos 5 cc y se mezcla con mucha agua. El producto
5. en bruto así precipitado se frota bien. se filtra en vacío, se lava con agua y se seca. Para la ulterior limpieza se disuelve y precipita el producto en dimetilformamida-éster acético y después se somete a una
10. distribución en contracorriente en el sistema de solventes metanol-tampón-cloroformo-tetracloruro de carbono (10:3:7:4) / tampón = 28,5 cc de ácido acético glacial y 19,3 g de acetato amónico en 960 cc de agua. Después de 120 escalones de distribución se
15. obtiene el derivado del amida del octapéptido protegido puro de los tubos 38 - 54 (máximo de peso en el tubo Nº 44, índice de distribución K = 0,58). El producto muestra en la cromatografía de capa delgada sobre
20. placas de gel de sílice los siguientes valores  $R_f$ :  
 $R_f$  en el sistema cloroformo-metanol (75:25) = 0,22  
 $R_f$  (43A) = 0,46
25. El amida del octapéptido protegido empleado como producto de partida, la H-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-NH<sub>2</sub>, se obtiene mediante condensación de Z-Lis(BOC-OH con H-Lis(BOC)-OCH<sub>3</sub> en presencia de dicitclohexilcarbodiimida, transformación del éster del dipéptido protegido en el amida con gas de amoniaco en metanol, disociación del radical carbobenzoxi con hidrógeno en presencia de carbón-paladio y condensación del H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
30. -NH<sub>2</sub> así obtenido con el Z-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)



-Lis(BOC)-NH-NH<sub>2</sub> descrito en la patente alemana 1.214.242, según el método de azida.

10) H-D-Ser-Tir-Ser-Nle-Glu-His-Phe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>

5. 0,5 g del amida del octapéptido protegido, limpiado por distribución de contracorriente, se disuelven en 10 cc de ácido trifluoracético al 90% frío como el hielo y la solución se deja a continuación durante una hora a 25°. Después se concentra en vacío a un volumen pequeño y la sal trifluoracética del amida del octapéptido libre se precipita mediante adición de mucho éter libre de peróxido. El producto higroscópico se filtra en vacío, se lava con éter y se seca.
10. Para la transformación en el acetato se disuelve en ácido acético al 1%, se filtra a través de una columna de intercambiador de iones débilmente básico (Merck nº II) en forma de acetato y se lava ulteriormente con ácido acético al 1%. El eluado se evapora bajo adición de n-octanol a 40° en vacío, el residuo se lava para retirar el octanol con éter de petróleo y se seca. Seguidamente se disuelve en poca agua y se liofiliza.
15. Se obtiene el acetato del amida del octapéptido, la D-Ser<sup>1</sup>-Nle<sup>4</sup>-Lis<sup>17,18</sup>-β<sup>1,18</sup>-corticotropina-Lis<sup>18</sup>-amida como polvo seco, casi blanco. El amida del octapéptido muestra en la electrofóresis de papel a un pH de 6,3 un trayecto de recorrido de 10 cm. (hacia el cátodo) (papel: Schleicher & Schüll 2043/b, mg1; tampón de piridina-acetato; 1 hora, 2000 V). En la cromatografía de capa delgada sobre placas de óxido de aluminio muestra los siguientes valores R<sub>f</sub>:
20. Se
25. En la cromatografía de capa delgada sobre placas de óxido de aluminio
30. muestra los siguientes valores R<sub>f</sub>:

28 DIC 1967

R<sub>f</sub> (52 A) = 0,18

R<sub>f</sub> (101) = 0,25

Ejemplo 2

5. Se prepara una ampolla de solución de los siguientes componentes:

Acetato de D-Ser<sup>1</sup>-Nle<sup>4</sup>-Lis<sup>17,18</sup>-β<sup>1-18</sup>-corticotropina-Lis<sup>18</sup>-amida 0,5 mg

Gelatina 280,0 mg

fenol 5,0 mg

10. Agua destilada 1,0 cc.

Ejemplo 3

15. Una solución acuosa esterilmente filtrada de acetato de D-Ser<sup>1</sup>-Nle<sup>4</sup>-Lis<sup>17,18</sup>-β<sup>1-18</sup>-corticotropina-Lis<sup>18</sup>-amida se mezcla bajo condiciones asépticas con polifloretofوسفato de sodio y cloruro sódico y se llena en viales y se liofiliza, de manera que se obtiene un vial seco que contienen los componentes siguientes:

20. Acetato de D-Ser<sup>1</sup>-Nle<sup>4</sup>-Lis<sup>17,18</sup>-β<sup>1-18</sup>-corticotropina-Lis<sup>18</sup>-amida 0,5 mg

Polifloretofوسفato de sodio (al 86,5%) 23,20 mg

NaCl 12,28 mg

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

Ejemplo 4

30. 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 acetato de D-Ser<sup>1</sup>-Nle<sup>4</sup>-Lis<sup>17,18</sup>-β<sup>1-18</sup>-corticotropina-Lis<sup>18</sup>-amida en 0,7 cc de agua



destilada y se completa con agua destilada a 1 cc.  
La solución se trata en el autoclave a 120° durante  
20 minutos. El pH es, después de la esterilización,  
de 3,7.

5. Ejemplo 5

Se disuelven en 0,7 cc de solución de cloruro  
sódico fisiológico 0,5 mg de acetato de D-Ser<sup>1</sup>-  
-Nle<sup>4</sup>-Lis<sup>17,18</sup>-β<sup>1-18</sup>-corticotropina-Lis<sup>18</sup>-amida y  
la solución se acidifica con ácido clorhídrico 0,1N  
a un pH de 3,2. Con agua destilada se completa a  
1 cc y se trata en el autoclave a 120° durante 20 mi-  
nutos.

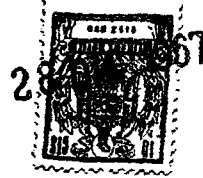
Ejemplo 6

En 0,8 cc de agua destilada se prepara una  
solución de 10,16 mg de ácido cítrico (con 1 mol de  
agua de cristal), 0,097 cc de sosa cáustica 1N, 3,54  
mg de cloruro sódico y 0,51 cc de ácido clorhídrico  
0,1N. En esta solución se disuelven 4,0 mg de acetato  
de D-Ser<sup>1</sup>-Nle<sup>4</sup>-Lis<sup>17,18</sup>-β<sup>1-18</sup>-corticotropina-Lis<sup>18</sup>-  
-amida y se completa con agua destilada a 1,0 cc. La  
solución se filtra en la forma usual, se llena en am-  
pollas y se trata en el autoclave durante 20 minutos  
a 120°.

Ejemplo 7

25. Se prepara una suspensión de los siguientes  
componentes:

Acetato de D-Ser <sup>1</sup> -Nle <sup>4</sup> -Lis <sup>17,18</sup> -β <sup>1-18</sup> -	
-corticotropina-Lis <sup>18</sup> -amida	1,0 mg
ZnCl <sub>2</sub>	5,25mg
30. Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,05mg
NaCl	2,0 mg



Ejemplo 8

Se prepara una suspensión de los siguientes componentes:

- |     |   |         |
|-----|---|---------|
|     | Acetato de D-Ser <sup>1</sup> -Nle <sup>4</sup> -Lis <sup>17,18</sup> - $\beta$ 1-18- |         |
| 5.  | -corticotropina-Lis <sup>18</sup> -amida  | 1,0 mg  |
|     | ZnCl <sub>2</sub>   | 6,30 mg |
|     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O                                 | 1,26 mg |
|     | NaCl  | 1,5 mg  |
|     | Alcohol bencílico   | 10,0 mg |
| 10. | NaOH ad pH 8,3  |         |
|     | Agua destilada ad   | 1,0 cc  |

Ejemplo 9

- 2,0 g de ácido poli-L-glutámico con un peso molecular promedio de unos 39.600 se disuelven en unos 5,7 cc de sosa cáustica al 10% de manera que el pH de la solución asciende a 7,4. En esta solución se disuelven entonces 10 mg de acetato de D-Ser<sup>1</sup>-Nle<sup>4</sup>-Lis<sup>17,18</sup>- $\beta$  1-18-corticotropina-Lis<sup>18</sup>-amida y 0,2 mg de mertiolato y se completa con agua destilada a 10 cc. La solución se filtra en forma estéril. Contiene por cc:

- |     |   |          |
|-----|---|----------|
|     | Acetato de D-Ser <sup>1</sup> -Nle <sup>4</sup> -Lis <sup>17,18</sup> - $\beta$ 1-18- |          |
|     | -corticotropina-Lis <sup>18</sup> -amida  | 1,0 mg   |
|     | Acido poli-L-glutámico  | 200,0 mg |
| 25. | Sosa cáustica hasta un pH de 7,4  |          |
|     | Mertiolato  | 0,02 mg  |
|     | Agua destilada ad   | 1,0 cc   |

N O T A

30. Descrita suficientemente la naturaleza del invento así como la manera de realizarlo en la prác-



1967

- tica, 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 fechas y números siguientes: 30 de diciembre de 1966, nº 18846/66; 23 de junio de 1967, nº 8952/67 y 30 de noviembre de 1967, nº 16881/67; acogiéndose 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 OBTENCION DE PEPTIDOS CON EFECTO ACTH"; caracterizándose por lo siguiente:
15. 1ª.- Procedimiento para la obtención de péptidos con efecto ACTH, caracterizado porque en la D-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-glicil-L-lisil-L-profil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-lisin-amida o del compuesto correspondiente, que en lugar del resto glutámico muestra el resto de la glutamina, en cuyos péptidos por lo menos el radical  $\alpha$ -amino y los radicales amino de cadena lateral, así como un radical carboxilo de cadena lateral, en caso dado existente, están protegidos, se disocian los grupos protectores y, si se desea, los compuestos obtenidos se transforman en sus sales de adición de ácido o complejos.
20. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación
- 25.
- 30.

28



1ª, caracterizado porque se parte de un péptido en el que los radicales amino están protegidos por el radical terc.-butiloxicarbonilo y el radical carboxilo por el radical terc.-butiléster.

5. 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque todos los grupos protectores se disocian mediante ácido trifluoroacético.

10. 4ª.- Procedimiento para la obtención de D-seril-L-tirosil-L-seril-L-norleucil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofil-glicil-L-lisil-L-profil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-lisil-L-lisin-amida, sus sales de adición de ácido y complejos, caracterizado porque de la amida mencionada, en la que los radicales  $\alpha$ -amino y los radicales amino de cadena lateral están protegidos por el radical terc.-butiloxicarbonilo y el radical carboxilo de cadena lateral por el radical terc.-butiléster, se disocian los grupos protectores.

15. 5ª.- Procedimiento para la obtención de péptidos con efecto ACTH; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 21 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

28 DIC 1967

CIBA SOCIÉTÉ ANONYME.

25.

L. GOMEZ ACEBO Y MODET  
6: P. Firmador: F. Hernández Ruiz