

PATENTE DE INVENCION

Ref: Case 6548/1-6



370704

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C-07</u> <u>A-61</u>
SUBCLASE <u>C</u> <u>B</u>

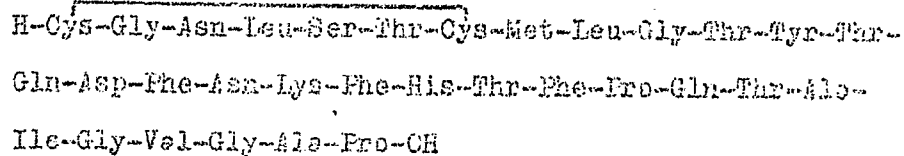
Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE
PEPTIDOS DE EFICACIA HIPOCALCEMICA

Solicitante: C I B A Société Anonyme, entidad suiza,
residente en Basilea, Suiza.

El objeto de la invención es el nuevo péptido
de eficacia hipocalcémica de fórmula I



5.

y los compuestos correspondientes, en los cuales uno o

BAD ORIGINAL



- varios restos de asparagina y glutamina estén substituidos por el resto del ácido asparagínico, o bien el resto del ácido glutamínico y/o el resto del ácido asparagínico por el resto asparagina, sus dímeros, especialmente aquellos en los cuales 2 secuencias de péptidos iguales (1 - 32 y 1'-32') en disposición antiparalela, via los restos cisteínicos 1,7' y 7,1' estén enlazados mediante enlace disulfúrico, y los derivados de los péptidos monómeros o dímeros así como las sales de adición de ácido y los complejos de los péptidos monómeros y dímeros mencionados y sus derivados, y el procedimiento para la obtención de estos compuestos.
- 5.
- 10.

- Derivados son, por ejemplo, las amidas, especialmente las amidas con la terminal C, que están sin substituir en el nitrógeno.
- 15.

Otros derivados de los compuestos mencionados son aquellos en los cuales como mínimo el grupo α -amino está acilado, así como los desamino¹-péptidos correspondientes.

- Los grupos acilo para la acilación de los grupos amino, especialmente para la acilación del grupo N ^{α} -amino, son los restos de ácidos carboxílicos, tales como los ácidos carboxílicos alifáticos, aromáticos, alicíclicos, heterocíclicos y heterocíclico-alifáticos, especialmente de ácidos alcánicos inferiores, mono- o bivalentes, tales como el ácido fórmico, el ácido acético, el ácido propiónico, los ácidos butíricos, el ácido valérico, el ácido succínico, de los ácidos carboxílicos alicíclicos, tales como los ácidos cicloalquilcarboxílicos, de ácidos
- 20.
- 25.



- carboxílicos aromáticos, monocíclicos, mono e bivalentes, tales como el ácido benzoico sin sustituir o sustituido, o el ácido ftálico, de ácidos aril-alquilo inferior- ó -alquénil-carboxílicos, aril-sustituídos, tales como el
5. ácido fenilacético, de ácidos heterocíclicos, mono o bivalentes, de 5 hasta 6 miembros, sin sustituir o sustituidos, con nitrógeno, azufre y/o oxígeno como heteroátomo, tales como los ácidos piridincarboxílicos, los ácidos tiofencarboxílicos, o de ácidos heterocíclico-elcénicos inferiores, tales como el ácido piridilacético, el ácido imidazolilacético, donde los sustituyentes de los anillos son por ejemplo, átomos de halógeno, grupos nitro, grupos de
10. alquilo inferior o alcoxi inferior ó carbaloxi inferior. Además son de mencionar, como restos acilo, entre todo, los
15. restos acilo de aminoácidos, especialmente de los α -aminoácidos, tales como, por ejemplo, el resto piroglutamílico, además, los restos acílicos que se derivan del ácido carbónico o del ácido tiocarbónico, o bien sus ésteres o amidas, por ejemplo, los grupos alquiloxi inferior-carbonilo,
20. tales como el etoxicarbonilo, el terc.-butiloxicarbonilo, además el benciloxicarbonilo, sin sustituir o sustituido como arriba indicado, carbamoilo y tiocarbamoilo, así como el carbamoilo y tiocarbamoilo N-sustituido, por ejemplo, el N-alquilo inferior-carbamoilo, N-fenilcarbamoilo, N-fenil-tiocarbamoilo.
- 25.

Como sales de edición de ácido son de mencionar, especialmente, las sales de los ácidos de aplicación terapéutica, tales como el ácido clorhídrico, el ácido acéti-



co, el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico y los ácidos sulfónicos, tales como los ácidos alcano inferior-sulfónicos, el ácido benceno- o toluenosulfónico.

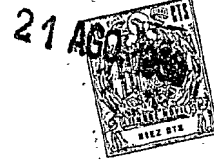
- Bajo complejos se entienden los compuestos, en su estructura sin aclarar totalmente, que se forman al agregar ciertos productos orgánicos o inorgánicos a los péptidos de cadenas largas y le confieren a éste un efecto prolongador. Tales productos se describen, por ejemplo, para la insulina y para la ACTH y otros péptidos de eficacia adrenocorticotrópica. Son de mencionar, por ejemplo, los compuestos inorgánicos que se derivan de los metales, tales como el calcio, el magnesio, el aluminio, el cobalto y especialmente del cinc, ante todo las sales de difícil solubilidad, tales como los fosfatos, pirofosfatos y polifosfatos, así como los hidróxidos de estos metales, en caso de en combinación con sustancias orgánicas ácidas, por ejemplo, polisacáridos que contienen grupos ácidos, tales como la celulosa carboximetilica, o el ácido ténico, el ácido poliglutámico o la gelatina parcialmente hidrolizada, además, los polifosfatos de metal alcalino, tales como por ejemplo, "Calgon N", "Calgon 322", "Calgon 188" ó "Poliron B 12". Las sustancias orgánicas que producen una prolongación del efecto son, por ejemplo, las gelatinas no antigenas, por ejemplo, la polioxigelatina, la polivinilpirrolidona y la celulosa carboximetilica, además, los sulfonatos o fosfatos del ácido algínico, dextrano, polifenoles y polialcoholes, ante todo el poliforetinfosfato y el ácido fitínico, así como los polímeros y copolímeros de los
5. su estructura sin aclarar totalmente, que se forman al agregar ciertos productos orgánicos o inorgánicos a los péptidos de cadenas largas y le confieren a éste un efecto prolongador. Tales productos se describen, por ejemplo, para la insulina y para la ACTH y otros péptidos de eficacia adrenocorticotrópica. Son de mencionar, por ejemplo, los compuestos inorgánicos que se derivan de los metales, tales como el calcio, el magnesio, el aluminio, el cobalto y especialmente del cinc, ante todo las sales de difícil solubilidad, tales como los fosfatos, pirofosfatos y polifosfatos, así como los hidróxidos de estos metales, en caso de en combinación con sustancias orgánicas ácidas, por ejemplo, polisacáridos que contienen grupos ácidos, tales como la celulosa carboximetilica, o el ácido ténico, el ácido poliglutámico o la gelatina parcialmente hidrolizada, además, los polifosfatos de metal alcalino, tales como por ejemplo, "Calgon N", "Calgon 322", "Calgon 188" ó "Poliron B 12". Las sustancias orgánicas que producen una prolongación del efecto son, por ejemplo, las gelatinas no antigenas, por ejemplo, la polioxigelatina, la polivinilpirrolidona y la celulosa carboximetilica, además, los sulfonatos o fosfatos del ácido algínico, dextrano, polifenoles y polialcoholes, ante todo el poliforetinfosfato y el ácido fitínico, así como los polímeros y copolímeros de los
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.



aminoácidos, por ejemplo, la protamina o el ácido poliglu-
támico,

- Los nuevos compuestos muestran un efectos hipocalcémico. Así muestra el amida con terminal C del compues-
to de fórmula I, en la rate, una actividad de aproximada-
mente 100 - 200 unidades MRC por mg (péptido) en el ensayo
5. descrito por Kumar et al., J. Endocrinology 33, /1965/,
470. Los nuevos compuestos bajan el contenido del calcio,
calcio y fósforo en el plasma sanguíneo de los mamíferos,
10. tal y como se demostró mediante ensayos en ratas de 50 -
150 g de peso. En los pecientes con metabolismo óseo aumentado bajan el nivel de calcio en la sangre en administra-
ción intravenosa, intramuscular o subcutánea de 0,01 hasta
5 mg, por ejemplo, en tampón de acetato 0,1-M del pH
15. 4,6. Por lo tanto se pueden emplear para el tratamiento de
hipercalcemias y de enfermedades óseas, tales como el
Paget's disease o la osteoporosis.

- Los compuestos de fórmula I con grupo carboxilo
C-terminal libre son de por si poco activos, pero se pue-
den emplear como productos intermedios o de partida para la
20. preparación de compuestos activos. Así se pueden transformar
mes, por ejemplo, en la correspondiente Asp¹⁵, Pro³²-diamida
que es igual de eficaz como la calcitonina M, por ejemplo,
transformando el producto de fórmula I mediante terc.butil-
25. oxycarbonilización en el producto N^α, N^ε-di-BOC protegido,
formando después con amoníaco, en presencia de diciohexil-
carbodiimida e hidroxisuccinimida, la diamida y finalmente
disociando los grupos BOC con ácido, por ejemplo, ácido cítrico



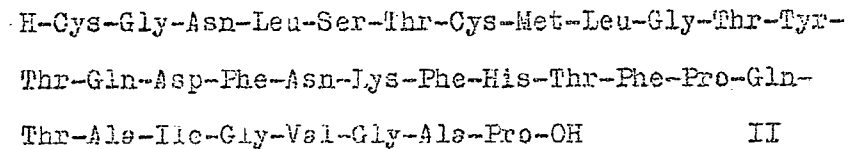
hídrico o ácido trifluoroacético.

El procedimiento según la presente invención para la obtención de los nuevos péptidos monomeros o dímeros, sus derivados, sus sales de edición de ácido y complejos se caracterizo porque

5. 1. en los compuestos de fórmula I, o los mencionados análogos, o derivados, o dímeros de estos compuestos, en cuyos compuestos como mínimo un grupo amino, o un grupo carboxilo está protegido por un grupo protector dissociable,

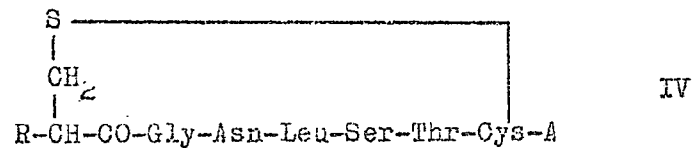
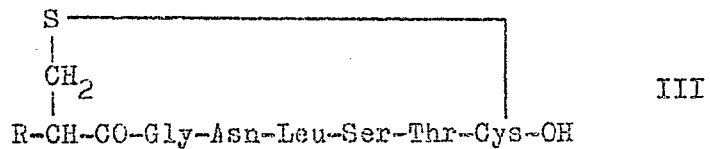
10. el (los) grupo(s) protectores se disocia(n), ó

2. los compuestos de fórmulas II



15. o los mencionados análogos o derivados, donde los grupos mercapto estén libres o protegidos por el grupo tritilo, se oxidan a disulfuros, ó

3. los compuestos de fórmulas III ó IV



20. en los que A signifique 1 hasta 21 de los restos de ácido amínico que siguen a Cysteins⁷ con grupo amino de cadena lateral, en caso dado protegido, y R significa hidrógeno o un radical amino acilado, se condensan con la restante se-



21 AGO 1960

- cuencia C-terminal del péptido con grupo amino de cadena lateral, en caso de ser protegido, hasta el aminoácido C-terminal (L-prolina) según los métodos conocidos en la síntesis de los péptidos, bajo la condición de que se emplee un método que parte de un grupo ácido carboxílico activo-
5. do, tal como el método éster, el método anhídrido o el método de los ésteres activados, cuando la secuencia C-terminal muestre un grupo carboxilo libre, y, si se desee, los
10. compuestos monómeros obtenidos se transforman en sus dímeros o los péptidos monomeros o dímeros libres se transforman en sus derivados y/o sales de adición de ácido o complejos.

- Para la obtención de los productos de partida,
15. para la primera variante del procedimiento según la presente invención, así como también de todos los productos intermedios necesarios en las tres variantes del procedimiento, entran en consideración como grupos protectores especialmente los conocidos por la síntesis de los péptidos de cadena larga, así como algunos grupos protectores nuevos que
20. se pueden disociar fácilmente, por ejemplo, por hidrólisis, reducción, aminólisis o hidrazinólisis.

- Así se emplean, por ejemplo, como grupos protectores para los grupos amino los grupos acilo o aralquilo,
25. tales como los grupos formilo, trifluoroaceto, ftaloilo, bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2,4-dinitrofenilsulfenilo (estos radicales sulfenilo pueden disociarse también por los efectos de reactivos nucleófilos, por ejemplo, sulfitos, tiosulfatos, véase la pe-



- tente inglesa 1 104 271), grupos bencilo, en caso dado sustituidos, tal como, por ejemplo, por grupos alcoxi inferior, especialmente grupos o- ó p-metoxi, o grupos difenilo- o trifenilmetilo, o grupos que se derivan del ácido carbónico, tales como los grupos arilmtiloxicarbonilo en caso dado sustituidos en los anillos aromáticos, por ejemplo, por átomos de halógeno, tal como cloro o bromo, grupos nitro, grupos alquilo inferior o alcoxi inferior, o grupos coloradores, por ejemplo, grupos azoicos, en los cuales el grupo metileno puede estar sustituido por otro resto arilo y/o uno o, en caso dado, dos restos de alquilo inferior, tales como los grupos bencilo, benzhidrilo o 2-fenil-isopropiloxicarbonilo, por ejemplo, carbobenzoxi, p-bromo- o p-clorocarbobenzoxi, p-nitrocarbobenzoxi, p-metoxicarbobenzoxi, p-fenilazo-benziloxicarbonilo y p-(p'-metoxi-fenilazo)-benciloxicarbonilo, 2-tolil-isopropiloxicarbonilo y, especialmente, 2-(p-bifenilil)-isopropiloxicarbonilo [véase la solicitud 1073/67 (Caso 6106)], así como los grupos oxicarbonilo alifáticos, tales como el adamantiloxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, tricloroetiloxicarbonilo, terc. amiloxicarbonilo o, ante todo, terc.-butiloxicarbonilo.
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

Los grupos amino pueden protegerse también mediante formación de enaminas, obtenidas por reacción del grupo amino con 1,3-dicetonas, por ejemplo, benzoilcetona, acetilacetona o dimedona.

25.

Los radicales carboxilo se protegen, por ejemplo, mediante formación de amida o hidrazida o por esterificación. Los grupos amida o hidrazida pueden estar, en caso dado,



- sustituidos, el grupo amida, por ejemplo, por el grupo 3,4-dimetoxibencilo ó bis-(p-metoxifenilo)-metilo, el grupo hidrazida, por ejemplo, por el grupo carbobenzoxi, el grupo tricloroetioxicarbonilo, el grupo trifluoracetilo, el grupo tritilo, el grupo terc.-butiloxicarbonilo o el grupo 2-(p-bifenilil)-isopropiloxicarbonilo. Para la esterificación son adecuados, por ejemplo, los alcoholes inferiores, en caso dado sustituidos, tales como el metanol, etanol, cianmetilalcohol, benzoilmetilalcohol o, especialmente, el terc.butanol, además, los aralcoholes, tales como los arilo inferior-alcoholes, por ejemplo, los alcoholes bencílicos o benzhidrídicos, en caso dado sustituidos por radicales alquilo inferior o alcoxi inferior, o átomos de halógeno, tales como el alcohol p-nitrobencílico, el alcohol p-metoxibencílico o el alcohol 2,4,6-trimetilbencílico, los fenoles y tiofenoles, en caso dado sustituidos por sustituyentes atraedores de electrones, tales como el tiofenol, el tiocresol, el p-nitro^{tio}fenol, el 2,4,5- y 2,4,6-triclorofenol, el pentoclorofenol, el p-nitrofenol, el 2,4-dinitrofenol, el p-cianofenol o el p-metanolsulfonilfenol, además, por ejemplo, la N-hidroxisuccinimida, la N-hidroxi-ftalimida, la N-hidroxipiperidina, la 8-hidroxiquinolina.

- Los radicales hidroxilo de los restos de la serina, treonina y tirosina se pueden proteger, por ejemplo, mediante esterificación o eterización. Como restos acílicos en la esterificación son adecuados los restos de alcoholes inferior, tales como el acetilo, los restos arilo, tales como el benzilo y, ante todo, los restos que se derivan del



ácido carbónico, tales como el benciloxicarbonilo o etiloxi-carbonilo. Grupos adecuados para la eterización son, por ejemplo, los restos bencilo, tetrahidropirrenilo ó terc.-butilo. Además, son adecuados para la protección de los radicales hidroxilo, los grupos 2,2,2-trifluor-1-terc.butil-oxycarbonilamino o -1-benciloxicarboxilaminoetilo (Weygend) (descritos en Ber. 100 (1967), 3838 - 3849).

Los radicales hidroxilo no necesitan, sin embargo, ser forzosamente protegidos,

10. Los radicales mercapto de los restos cisteina se protegen, por ejemplo, por acilización o alquilización.

Adecuado para la acilización es, por ejemplo, el resto acetilo o bencilo, un resto alquilo inferior-carbamoilo, por ejemplo, el resto etilcarbamoilo, o el resto carboben-zoxi, en caso dado sustituido. Para la alquilización son,

15. por ejemplo, adecuados el resto terc.butil- o benciltiome-tilo o los grupos arilmetilo, en caso dado sustituidos, tales como el bencilo, el p-nitrobencilo, el difenilmetilo, el dimetoxibenzhidrido o el tritilo, además, el fenilciclohexilo, el tienil(2)-ciclohexilo y otros más, véase Ber.

20. 101 (1968), 681. No es imprescindible proteger el grupo imino de la histidina, pero puede ser ventajoso protegerle, por ejemplo, por bencilo, tritilo, carboben-zoxi, adamentil-oxycarbonilo o los grupos de Weygend arriba indicados.

25. Preferentemente se emplea en la primera variante del procedimiento según la presente invención, para la protección del grupo carboxilo de la cadena lateral y en caso dado el grupo carboxilo terminal, el grupo terc.butiléster, para la protección del grupo amino de la cadena lateral, el



- grupo terc.butiloxycarbonilo, para los grupos hidroxilo de los restos serina, treonina y tirosina, siempre que estos se hayan de proteger, el grupo terc.butiléter y, si se desea, para la protección de la histidina, el grupo 2,2,2-trifluor-1-terc.butiloxi-carbonilaminoetilo. Todos estos grupos protectores se pueden disociar, si se desea, en una sola etapa mediante hidrólisis ácida, por ejemplo, mediante ácido trifluoroacético o ácido clorhídrico. Al sintetizar el decacontapéptido protegido, empleado en la primera variante del procedimiento como producto de partida, empleando grupos protectores disociables con ácido trifluoroacético o ácido clorhídrico, se protegen los grupos mercapto, preferentemente por bencilo o tritilo. Los radicales S-tritilo se pueden disociar selectivamente del péptido protegido en solución orgánica (bajo mantenimiento de los grupos disociables con ácido trifluoroacético) con mercuriacetato e hidrógeno sulfurado. Los radicales S-bencílicos se pueden disociar selectivamente del péptido protegido con sodio en amoniaco líquido. En ambos casos se obtiene el péptido protegido con radicales mercapto libres. Estos se pueden oxidar el disulfuro protegido, por ejemplo, con ácido acético glacial con yodo, con diyodoetano o diródano en disolventes orgánicos o con oxígeno del aire en amoniaco líquido. Es especialmente ventajoso proteger los grupos mercapto con grupos tritilo y retirar éstos del péptido protegido, bajo formación simultánea del puente disulfúrico, con yodo en metanol; véase la solicitud suiza nº 6999/68 (Case 6461). La formación del anillo disulfúrico se puede realizar en
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.



la etapa de una secuencia parcial que contenga los dos restos cisteína, por ejemplo, del decapeptido 1-10, o en la etapa del dotriacontapéptido.

5. En la segunda variante del procedimiento, según la presente invención, se puede preparar el péptido de cadena abierta, empleado como producto de partida, preferentemente asimismo con los grupos protectores mencionados en la variante primera. Los grupos S-tritilo se pueden retirar con ácido trifluoroacético y oxidar el péptido libre, de cadena abierta, en forma en si conocida con ferricianuro potásico en solución acuosa o con yodo o con aire en amoníaco líquido. Pero también se pueden retirar los grupos tritilo según el procedimiento arriba mencionado, con yodo y metanol, bajo formación simultánea del disulfuro.

10. Para la preparación de los derivados N-acílicos se puede emplear el grupo acilo como grupo protector amino,

15. Los péptidos monómeros obtenidos se pueden transformar ulteriormente, en forma en si conocida, en sus dímeros y viceversa y/o los péptidos monómeros o dímeros en sus derivados, sales de adición de ácidos y/o complejos. Las transformaciones ulteriores se pueden realizar en secuencia conveniente, individualmente o en combinación.

20. La transformación de los compuestos monómeros obtenidos en compuestos dímeros se efectúa, por ejemplo, mediante tratamiento con compuestos mercapto en medio neutro o débilmente ácido, por ejemplo, mediante tratamiento con hidrocioruro de cisteína. Los compuestos dímeros se pueden transformar bajo condiciones básicas, por ejemplo,

25.



con amoníaco diluido, en los compuestos monómeros.

5. Para la obtención de derivados acílicos se puede N-acilar el péptido libre en forma usual, por ejemplo, mediante reacción con un anhídrido mixto que contenga el resto acilo correspondiente o azida o, ante todo, con un éster activado, tal como el éster de fenilo o el éster de fenilo sustituido. La acilización se puede realizar, si se desea, en forma selectiva, de manera que solamente se acile el grupo α -amino.

10. La formación de las sales de adición de ácido se realiza en forma conocida.

También la formación de los complejos se efectúa según métodos conocidos o equivalentes a éstos.

15. Los complejos con productos inorgánicos, tales como los compuestos metálicos de difícil solubilidad, por ejemplo, los compuestos de aluminio o de cinc, se efectúan preferentemente en forma enéloga o como se conoce para el ACTH, por ejemplo, mediante reacción con una sal soluble del metal correspondiente, por ejemplo, cloruro de cinc o sulfato de cinc, y precipitación con un fosfato de metal alcalino y/o hidróxido alcalino.

20. Los complejos con compuestos orgánicos, tales como la polioxigelatina, celulosa carboximética, polivinilpirrolidona, polifloretofosfato, ácido poliglutámico, etc., se obtiene mezclando estas sustancias con el péptido en solución acuosa. En igual forma se pueden preparar también los compuestos insolubles con polifosfatos de metal alcalino.

25.

La invención se refiere también a aquellas formas



de ejecución del procedimiento en los cuales se parte de un producto intermedio, que se obtiene en cualquier etapa del procedimiento, y se realizan las etapas del procedimiento que faltan o el procedimiento se interrumpe en cualquier etapa y/o un producto de partida se forma "in situ" y/o se emplea en forma de una sal.

Los péptidos empleados como productos de partida se obtienen si los aminoácidos, si es necesario o si se desean, bajo empleo de grupos protectores fácilmente dissociables, se enlazan en la secuencia mencionada, individualmente o después de haber formado unidades de péptidos más pequeñas, formándose, en caso dado, en una etapa adecuada, la síntesis del puente disulfúrico. Se trabaja convenientemente según los métodos de enlace adecuados para la obtención de péptidos de cadena larga, teniendo en consideración el puente disulfúrico, tal y como se conoce por la literatura.

El enlace de las unidades aminoácido y/o péptido se efectúa, por ejemplo, haciendo reaccionar un aminoácido o un péptido con el radical α -amino protegido y grupo carboxilo terminal activado, con un aminoácido o un péptido con grupo α -amino libre y grupo carboxilo terminal libre o protegido, por ejemplo, esterificado o amidado, o reaccionando un aminoácido o un péptido con un grupo α -amino activado y radical carboxilo terminal protegido con un aminoácido o con un péptido con grupo carboxilo terminal libre y grupo α -amino protegido. El grupo carboxilo se puede activar, por ejemplo, mediante transformación en un azi-



- da, anhídrido, imidazolido de ácido, o en un éster activado, tal como el éster cianmetílico, éster tiofenílico, éster p-nitrotiofenílico, éster tiocresílico, éster p-metasulfotiofenílico, éster p-nitrotiofenílico, éster 2,4-dinitrofenílico, éster 2,4,5- ó 2,4,6-triclorotiofenílico, éster pentaclorotiofenílico, éster N-hidroxisuccinimídico, éster N-hidroxitetrahidropiridínico, éster 8-hidroxiquinolínico, éster N-hidroxipiperidínico, o mediante reacción con una carbodiimida (en caso dado bajo adición de N-hidroxi-succinimida), ó N-N'-carbonildiimidazol, o sal isoxazolínica, por ejemplo, el reactivo de Woodward, el grupo amino, por ejemplo, por reacción con un fosfito. Como métodos más usuales son de mencionar el método carbodiimida, el método según Weygand-Wünsch (carbodiimida en presencia de N-hidroxisuccinimida), el método azida, el método de los ésteres activados y el método anhídrido, además el método según Merrifield y el método de los N-carboxi-anhídridos o de los N-tiocarboxianhídridos.

- Además de la obtención de los productos finales represente también la obtención de los productos de partida, ante todo de la reacción del péptido que contiene el puente disulfúrico y su enlace con la parte restante del péptido, un objeto especial de la invención. Se ha descubierto que es ventajoso partir de una secuencia que comprende los primeros 10 aminoácidos N-terminales y condensar con este término N toda la secuencia restante.

Pero también se puede enlazar la mencionada secuencia N-terminal con el fragmento hasta el 28 aminoácido



(glicina) con grupo carboxilo C-terminal y condensar el octacosépéptido con el tetrapéptido de los aminoácidos 29 - 32. Este proceder es también especialmente adecuado para la preparación de los ésteres C-terminales, por ejemplo de aquellos que se derivan de alcoholes de cadena larga, o para la preparación de las amidas C-terminales N-sustituidas. La condensación se realiza, por ejemplo, según el método de Weygand-Wünsch. En caso de que se realice la condensación de la secuencia 1-10 con la secuencia C-terminal 11 - 32, se emplea preferentemente el método carbodiimida o el método según Weygand-Wünsch.

A continuación se explica con más detalle la preparación del decapeptido N-terminal (1 - 10).

Se puede sintetizar, por ejemplo, de las secuencias 1-4 y 5-10 ó 1-5 y 6-10 ó 1-6 y 7-10 ó 1-7 y 8-10, tal y como se aprecia de las figuras 1 - 8; pero también se pueden emplear otras fracciones para la síntesis de la secuencia 1 - 10.

Como grupo protector para el grupo α -amino en la cisteína¹ se emplea preferentemente el grupo terc.butiloxycarbonilo o un grupo equivalente, disociable por hidrólisis ácida, o, cuando se ha de preparar un dotriacontapéptido N $^{\alpha}$ -acilado, el correspondiente grupo acilo, por ejemplo, acetilo. Además se emplean convenientemente como grupos protectores de mercapto aquellos que se pueden disociar selectivamente en comparación con el grupo protector N $^{\alpha}$ -amino disociable por hidrólisis ácida (por ejemplo, el grupo terc.butiloxycarbonilo), por ejemplo, el grupo bencilo o



- tritrilo. El radical carboxilo terminal del decapeptido no necesita necesariamente ser protegido, por ejemplo, cuando la condensación se realiza según el método ezido o anhídrido. Este grupo se puede proteger sin embargo, también mediante esterificación, como arriba indicado, por ejemplo, mediante esterificación con metanol o etanol (disociación del grupo éster con lejía sódica diluida) o con alcohol bencílico o análogos (disociación del grupo éster, por ejemplo, con sodio en amoníaco líquido).
5. La protección del grupo amino de los productos intermedios se efectúa mediante los grupos protectores usuales, por ejemplo, carbobenzoxi, tritrilo, terc.butiloxicarbonilo ó 2-(p-bifenilil)-isopropiloxicarbonilo. Los grupos carboxilo de los productos intermedios, se esterifican, si es necesario, en la forma usual. Los grupos hidroxilo del resto serina y treonina se protegen por eterización, por ejemplo, con terc.butanol o equivalentes.
- 10.
- 15.

En las figuras e continuación y en los ejemplos signifique:

20. 1) el método ezido
2) el método de los anhídridos mixtos
3) el método de los ésteres activados, especialmente el éster p-nitrofenílico (ONP) o el éster hidroxisuccinimido (OSU)
25. 4) el método carbodiimido
5) el método según Weygand-Wünsch
BOC terc.butiloxicarbonilo
DPC 2-(p-bifenilil)-isopropiloxicarbonilo



- Z carbobenzoxi
- TRI tritilo
- Bzl bencilo
- OtBu terc.butiléster
- 5. OBzl benciléster
- ONB p-nitrobenciléster
- ONP p-nitrofeniléster
- OMe metiléster
- OEt etiléster
- 10. OCP 2,4,5-triclorofeniléster
- tBu terc.butiléter
- Ac acetilo
- Bmp β -mercaptopropionilo
- TFA ácido trifluoroacético

- 15. Los grupos p-nitrobenciléster y benciléster se disocian, en las secuencias que contienen metionina, con sodio en amoniaco líquido, en otros casos por hidrogenólisis en presencia de carbón de paladio, el grupo carbobenzoxi asimismo por hidrogenólisis, el grupo N-tritilo con ácido acético acuoso, el grupo terc.butiloxycarbonilo con ácido trifluoroacético, el grupo difenilisopropiloxycarbonilo con ácido acético acuoso o, por ejemplo, con una mezcla de ácido acético glacial, ácido fórmico (al 82,8 %) y agua (7:1:2), como descrito en la solicitud suiza 1073/67 (case 6106).
- 20.
- 25. El p-nitrobenciléster o el metiléster se puede transformar con hidrato de hidrazina en la hidrazida. Con lejía sódica diluida se hidroliza el grupo metiléster. El terc.butilés-



ter se disocia con ácido trifluoroacético, asimismo el terebutiléter. Los grupos S-tritilo se retiran con mercuriacetato e hidrógeno sulfatado, el grupo S-bencilico con sodio en amoniaco líquido, disociándose simultáneamente los grupos benciléster o p-nitrobenciléster en caso dado existentes. El cierre de anillo al disulfuro se efectúa, por ejemplo, por oxidación con 1,2-diyodoetano, el de los compuestos con S-tritilo protegido con yodo en metanol.

5. La secuencia C-terminal, se enlaza con la secuencia N-terminal, y que comprende los aminoácidos 11 hasta 32 o bien 11 hasta 28 se compone, por ejemplo, de las secuencias 11-16, 17-20, 21-28 y 29-32, tal y como muestra la figura 9.

10. En este esquema están protegidos los grupos hidroxilo de los restos treonina y del resto tirosina, esto, sin embargo, no es imprescindible. También se pueden reunir entre si otras secuencias parciales y emplear otros grupos protectores.

15. La figura 10 muestra la constitución del hexapéptido (en forma del hidrazida) de los aminoácidos 11-16. Este se puede enlazar según el método azida con la secuencia 17 - 28 ó 17 - 32.

20. La secuencia 17 - 28 se puede sintetizar según el método azida de los fragmentos 17-20 y 21-28.

25. La figura 11 muestra la síntesis del hidrazida de tetrapéptido de los aminoácidos 17-20, la figura 12 la sintetización del octapéptido 21-28. Después del enlace de las dos secuencias se disocia el grupo protector α -amino (el grupo carbobenzoxi por hidrogenólisis en presencia de



carbón de peladio) y el decapeptido obtenida con cadenas laterales protegidas se condensa según el método ezide con el hidrozida del hexapeptido 11 - 16 (Fig. 10).

5. La secuencia 11 - 28 así obtenida se puede enlazar con el amida del tetrapeptido de los aminoácidos 29 - 32, cuya obtención se muestra en la figura 13, por ejemplo, según el método de Weygand-Wünsch. Se obtiene entonces el amida del decapeptido 11 - 32 protegido. De este se puede disociar el grupo protector α -amino (carbобензохи, por ejemplo, hidrogenolíticamente, DPC con ácido acético al 90% o ácido acético glacial-ácido fórmico (al 82,8 %) - agua (7:1:2) y enlazar el compuesto así obtenido con grupo α -amino libre, después de retirar el ácido acético, con el decapeptido N-terminal (Fig. 1 - 8), por ejemplo, según el método de los anhídridos mixtos, de los ésteres activados (OSU) o según Weygand-Wünsch.
- 10.
- 15.

20. Pero también se puede enlazar la secuencia 11-28 con grupo carboxilo C-terminal libre, después de disociar el grupo protector α -amino en la forma mencionada, con el decapeptido N-terminal, según el método de los anhídridos mixtos y condensar el producto así obtenido con el tetrapeptido-amida 29 - 32, por ejemplo, según Weygand-Wünsch.

25. Otra posibilidad de sintetizar la secuencia 11-32 C-terminal consiste, por ejemplo, en componerla de las secuencias parciales 11 - 19 y 20 - 32, que se muestran en las figuras 14 y 15, preferentemente según el método de los anhídridos mixtos o según Weygand-Wünsch.



- Según el esquema de la figura 15 se puede preparar también la secuencia C-terminal con grupo carboxilo libre. En este caso no se disocia, por ejemplo, el grupo terc.butiléster existente en el aminoácido 32 y se transforma en el grupo amida, sino que se le mantiene hasta la etapa J. La condensación de la secuencia 20 - 32 con grupo carboxilo libre C-terminal con la secuencia 11 - 19 de la figura 14 se efectúa, por ejemplo, según el método de los anhídridos mixtos, asimismo el enlace de la secuencia 11 - 32, así obtenida, con la secuencia 1 - 10 N-terminal.
- 5.
- 10.

Del dotriscontapéptido-amida protegido se disocian los grupos protectores, por ejemplo, con ácido trifluoroacético o con ácido clorhídrico concentrado.

- El dotriscontapéptido con grupos SH libres o protegidos con tritilo, o emplear para el procedimiento según la variante 2), se puede preparar en forma análoga como el dotriscontapéptido protegido arriba descrito, con la diferencia de que los grupos SH protegidos se mantienen hasta el final de la síntesis. Solo después de que se hayan retirado todos los demás grupos protectores del dotriscontapéptido protegido se disocian los grupos protectores SH o bien se oxida el compuesto protegido con tritilo directamente como arriba descrito.
- 15.
- 20.

- El procedimiento según la variante 3) es especialmente adecuado para la preparación de productos finales en los cuales estén acilados el grupo α -amino y el grupo amino de cadena lateral. El decapeptido N^{α} -acilado se puede preparar, por ejemplo, según la figura 5 K; pero también se
- 25.



puede escoger como grupo protector amino, desde un principio, el grupo acilo e mantener. Los métodos de sintetización corresponden a los arriba descritos.

- Según el modo de trabajo se obtienen los nuevos compuestos en forma de bases o de sus sales. De las sales se pueden obtener las bases en forma en si conocida. De éstas últimas, a su vez, se pueden obtener, mediante reacción con ácidos que son adecuados para la obtención de sales de aplicación terapéutica, las sales, tales como, por ejemplo, aquellas conocidas ⁱⁿ orgánicas, tales como los hidrácidos halogenados, por ejemplo, el ácido clorhídrico o el ácido bromhídrico, el ácido perclórico, el ácido nítrico, el ácido tiociánico, los ácidos sulfúricos o fosfóricos, o los ácidos orgánicos, tales como el ácido fórmico, acético, propiónico, glicólico, láctico, pirúvico, oxálico, maléico, succínico, maléico, fumárico, málico, tártrico, cítrico, ascórbico, hidroximaléico, dihidroximaléico, benzóico, fenilacético, 4-aminobenzoico, 4-hidroxibenzóico, entrenílico, cinámico, mandélico, salicílico, 4-aminosalicílico, 2-fenoxibenzóico, 2-acetoxibenzóico, metenosulfónico, etenosulfónico, hidroxietenosulfónico, bencenosulfónico p-toluenosulfónico, naftalinsulfónico o sulfanílico.

- Los péptidos, obtenidos según el presente procedimiento, se pueden emplear en forma de preparados farmacéuticos. Estos contienen los péptidos en mezcla con un excipiente orgánico o inorgánico, farmacéutico, adecuado para la aplicación enteral o parenteral. Como tales entran aquellos productos en consideración que no reaccionan con los



- polipéptidos tales como, por ejemplo, la gelatina, lactosa, glucosa, sal común, fécula, estearato de magnesio, talco, los aceites vegetales, los alcoholes benéficos, la goma, los glicoles polialquilénicos, la vaselina, la colesteroína y otros excipientes medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar, por ejemplo, como liofilizados o en forma líquida, como soluciones, suspensiones o emulsiones. En caso deo estarán esterilizadas y/o contendrán adyuvantes, tales como agentes de conservación, estabilización, humectación o emulsión. Asimismo pueden contener otros materiales terapéuticamente valiosos.
- 5.
- 10.

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

15. En la cromatografía de capa delgada se emplean los siguientes sistemas:
- Sistema 37 : n-butenol-piridina-agua (46:31:23)
- " 43A : alcohol terc.amílico-isopropenol-agua (100:40:10)
20. " 43C : alcohol terc.amílico-isopropenol-agua (51:21:28)
- " 43E : alcohol terc.amílico-isopropenol-agua (32:32:36)
- " 45 : sec.butenol-amoniaco acuoso al 3% (70:30)
25. " 52 : n-butenol-ácido acético glacial-agua (75:7,5:21)
- " 52A : n-butenol+ácido acético glacial-agua (67:10:23)



- Sistema 53 : n-butanol-ácido fórmico-agua
(60:0,75:39)
- " 70 : acetato de etilo-piridina-agua
(40:20:40)
- " 79 : n-butanol-piridina-agua (34:33:33)
5. " 87 : isopropanol-ácido fórmico-agua
(77:4:19)
- " 89 : éster acético-acetona-agua (72:24:4)
- " 96 : sec.butanol-ácido acético glacial-agua
(67:10:23)
10. " 100 : acetato de etilo-piridina-ácido acético
glacial-agua (62:21:6:11)
- " 101 : n-butanol-piridina-ácido acético glacial-
agua (38:24:8:30)
- " 101A : n-butanol-piridina-ácido acético glacial-
agua (42:24:4:30)
15. " 102A : acetato de etilo-metiletilcetona-ácido fór-
mico-agua (50:30:10:10)
- " 102E : éster acético-metiletilcetona-ácido acéti-
co glacial-agua (50:30:10:10)
20. " 104 : cloroformo-metanol-amoniaco acuoso al 17%
(41:41:18)
- " 107 : acetato de etilo-piridina-agua (49:24:27)
- " 110 : acetato de etilo-n-butanol-piridina-ácido
acético glacial-agua (42:21:21:6:10)
25. " 115 : acetato de etilo-piridina-ácido fórmico-
agua (63:21:10:6)
- " 121A : isopropanol-amoniaco(al 26 %)-agua
(85:5:10)



- Sistemas 1 : benceno-etanol (80:20)
" 2 : benceno-etanol (90:10)
" 3 : benceno-etanol (95:5)
" 4 : alcohol n-amílico-ácido fórmico-agua
(70:20:10)
5. " 5 : n-butanol-ácido acético-agua (66,6:16,7:16,7)
" 6 : n-butanol-piridina-ácido acético-agua
(66,6:12,5:4,2:16,7)
" 7 : alcohol n-amílico-piridina-agua (50:30:20)
10. " 8 : cloroformo-metanol-ácido acético glicial
(87,4:9,7:2,9)
" 9 : benceno-etanol (70:30).

15. La cromatografía de capa delgada se efectúa sobre gel de sílice (Silicogel) u óxido de aluminio ("Alex" D-O de la firma Camag con un 8 % de yeso) o sobre celulosa ("Selecta 1440" de la firma Schleicher und Schuell).

-26-174

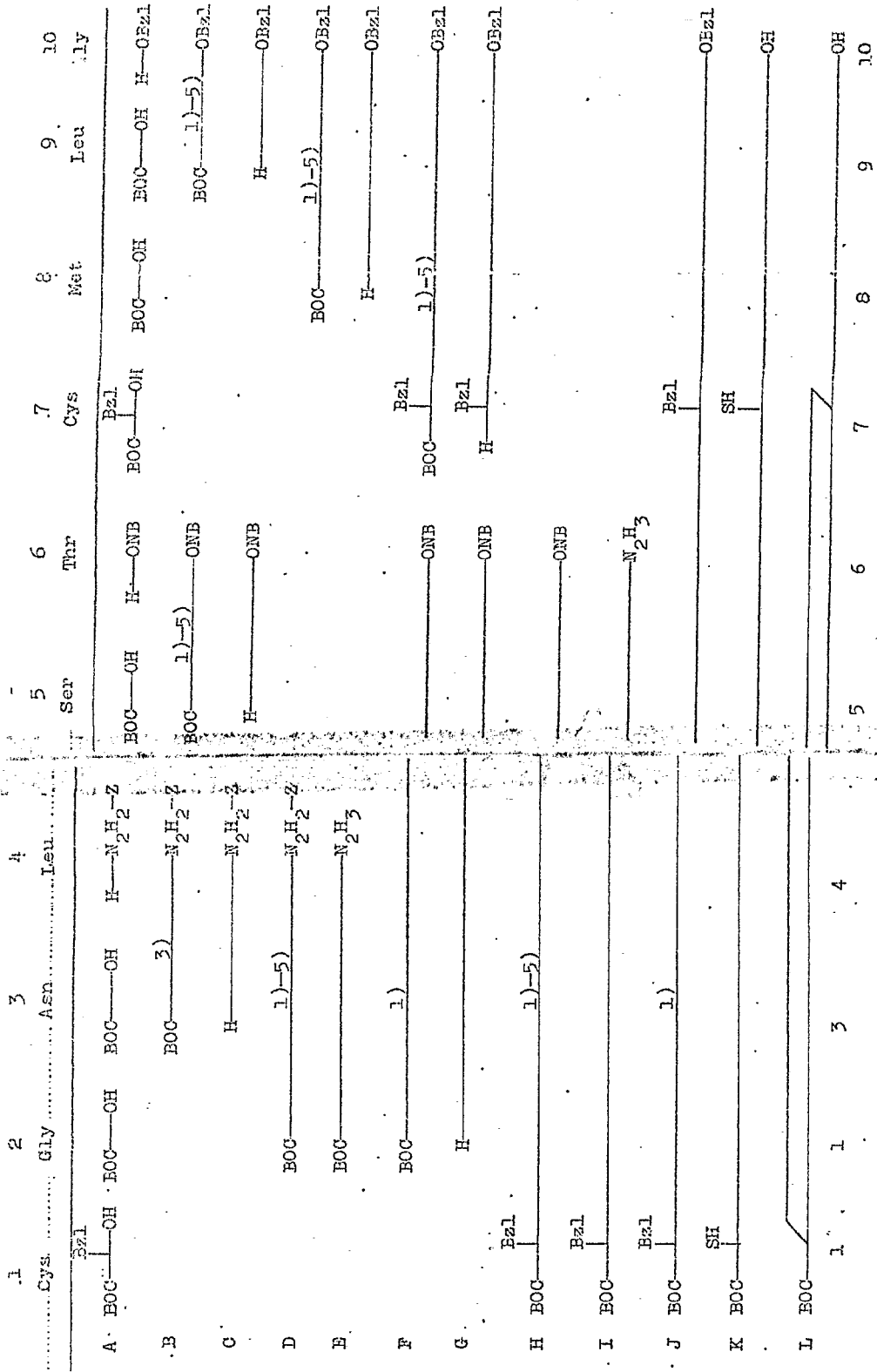


Fig. 1

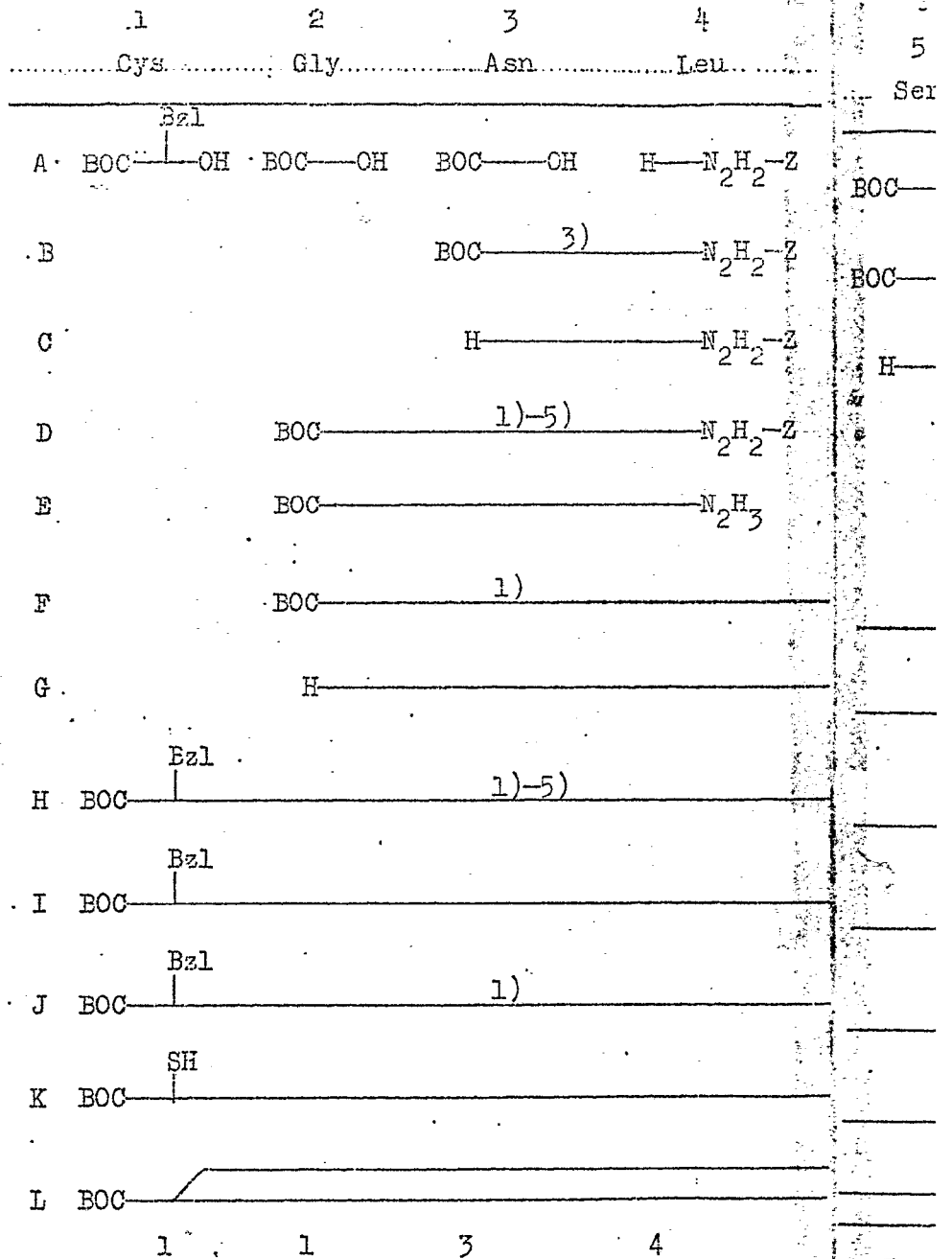


Fig.

-26- 12is

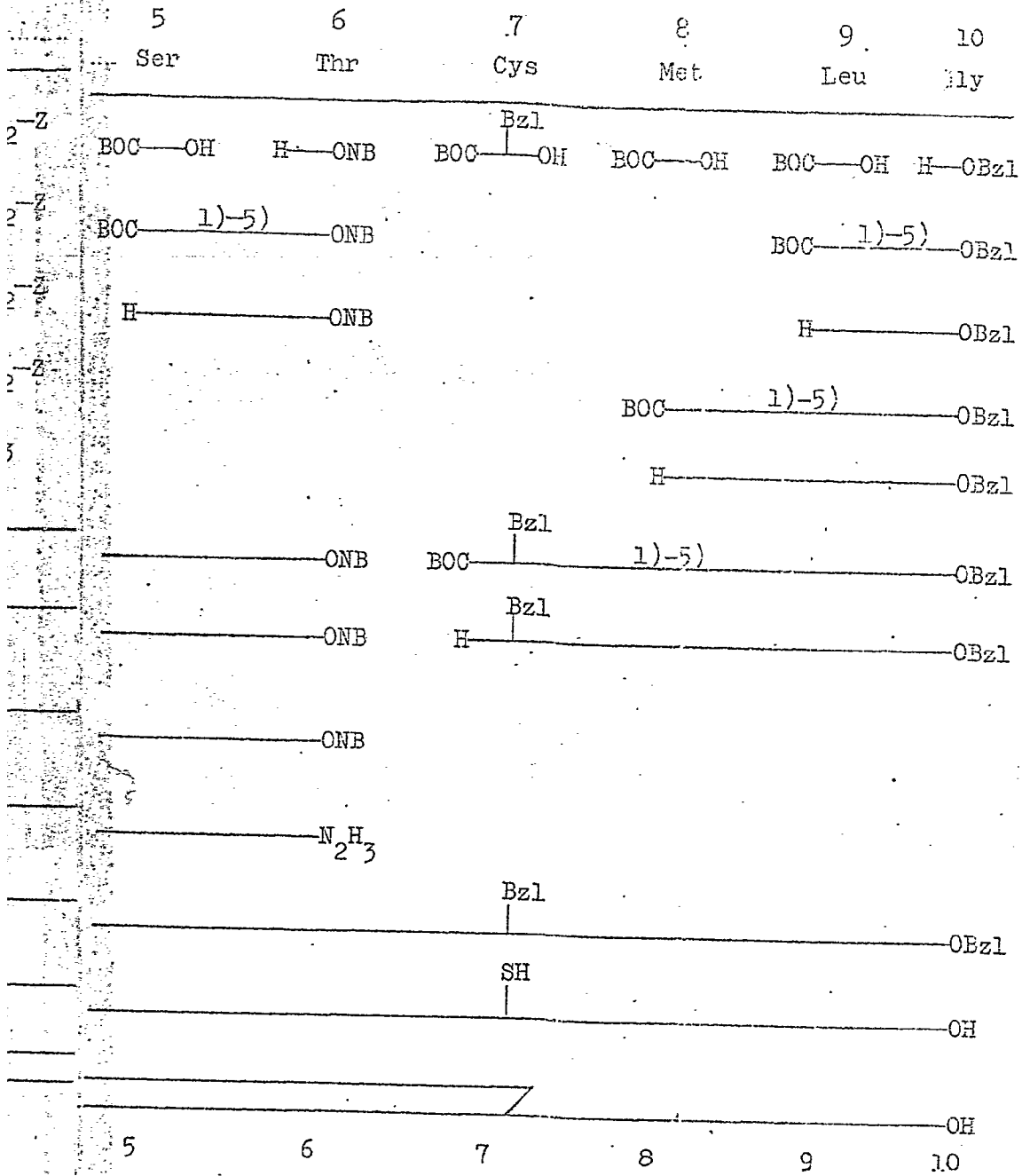
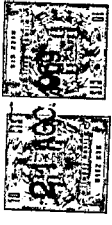


Fig. 1



- 27 -

- 27 -

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly
A	Bzl BOC-CH	Z-OH	BOC-OH	BOC-OH	BOC-OH	H-OBzl	BOC-OH	BOC-OH	BOC-OH	H-OBzl
B	BOC		BOC	BOC	BOC	OBzl		BOC	BOC	OBzl
C					H	OBzl			H	OBzl
D			BOC	BOC	BOC	OBzl		BOC	BOC	OBzl
E			H			OBzl		H		OBzl
F			BOC	BOC	BOC	OBzl	Bzl BOC		BOC	OBzl
G			H			OBzl	H			OBzl
H		Z				OBzl				
I		H				OH				
J	Bzl BOC		BOC	BOC	BOC	OH				
K	Bzl BOC						Bzl			OBzl
L	BOC						SH			OH
M	BOC									OH

Fig. 2

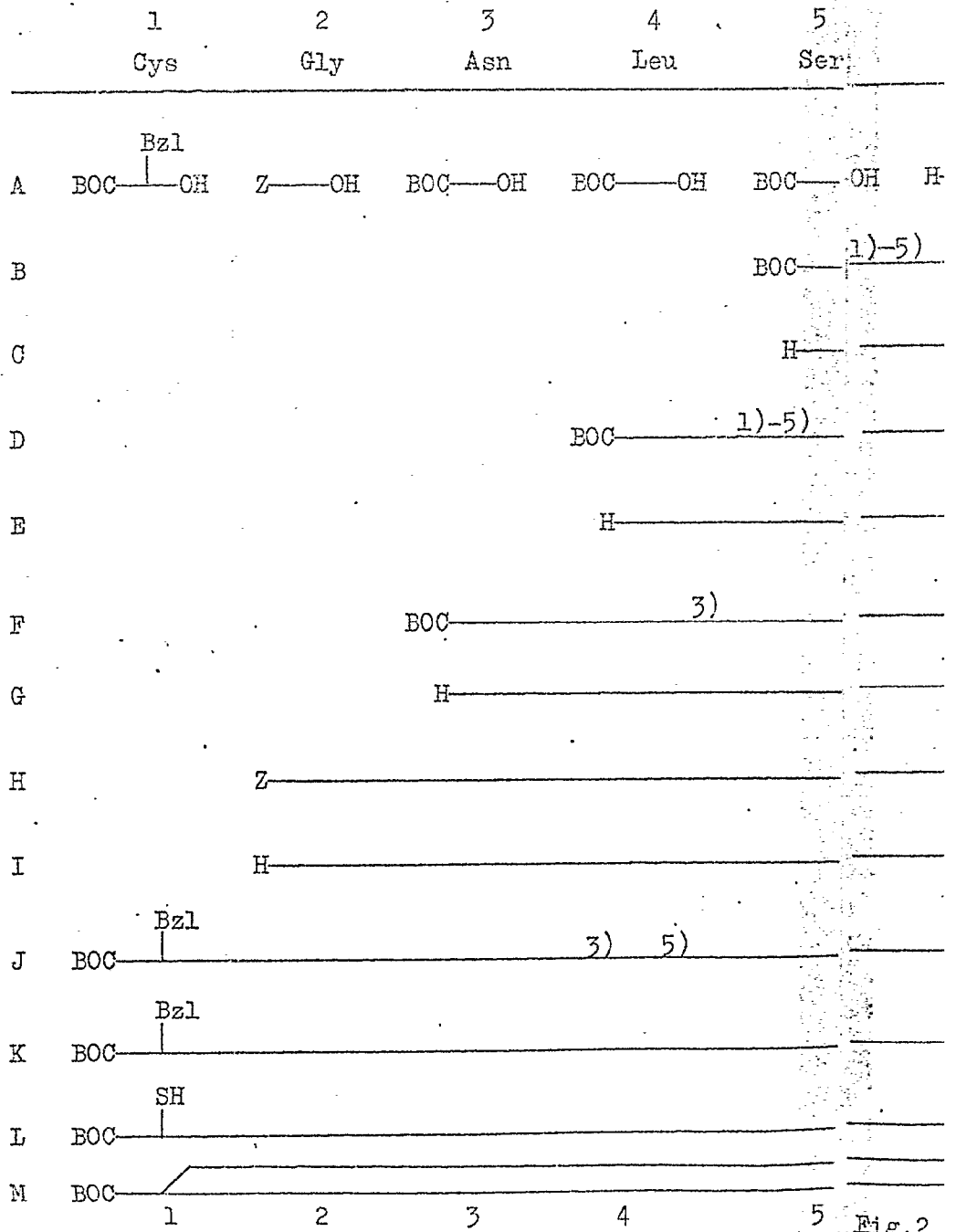


Fig. 2

- 27 - Bin

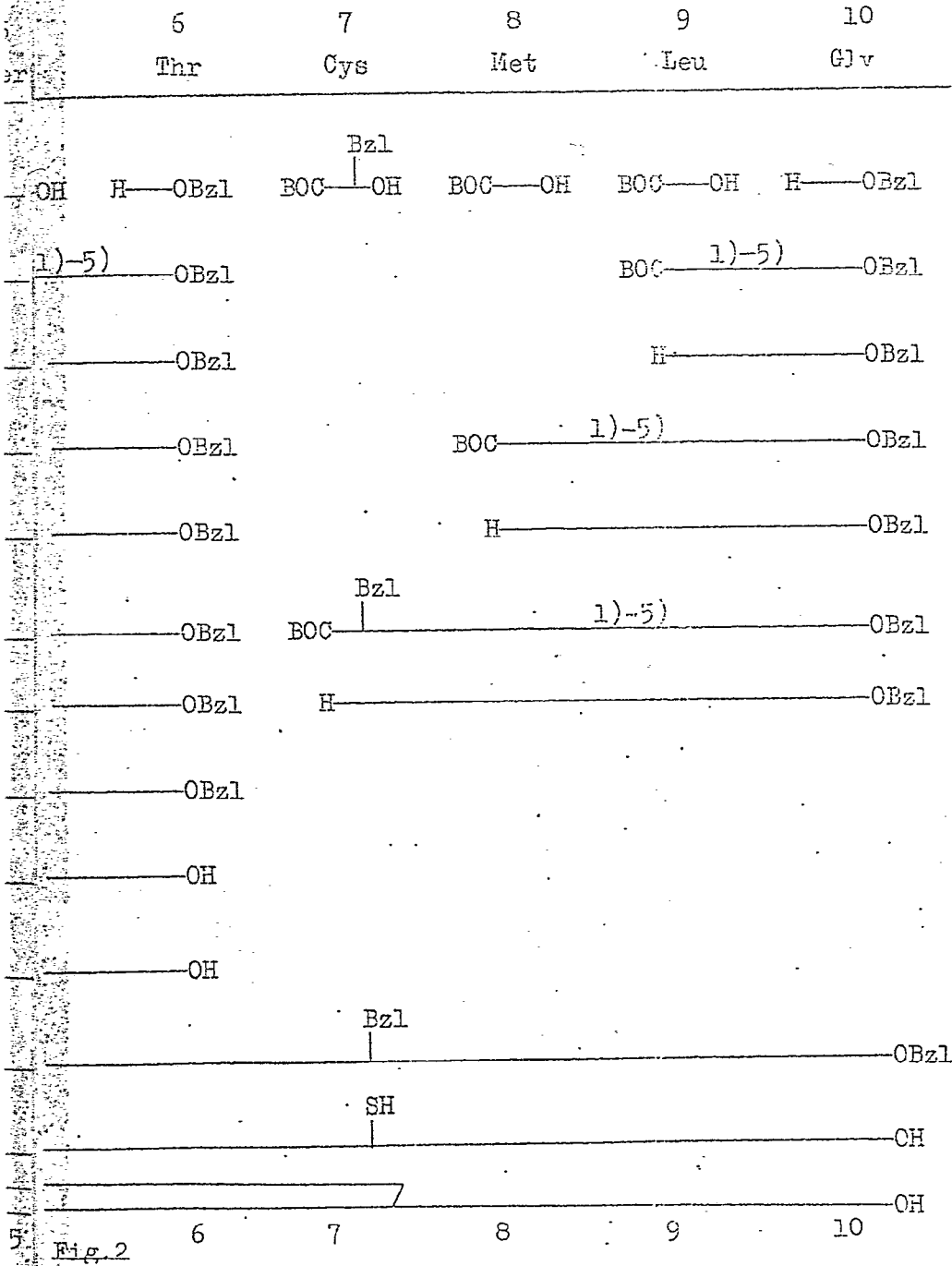


Fig. 2

28-134

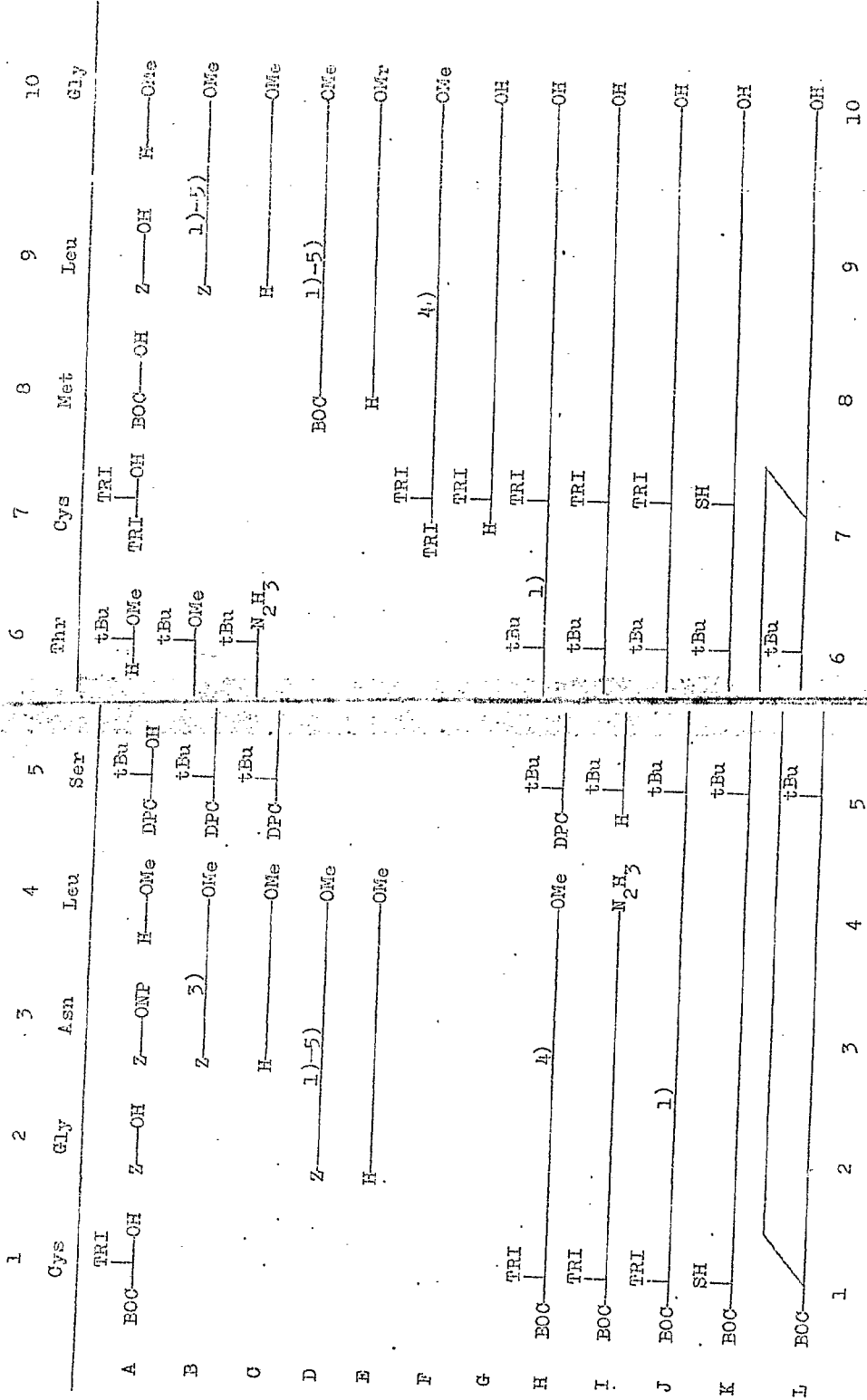


Fig.

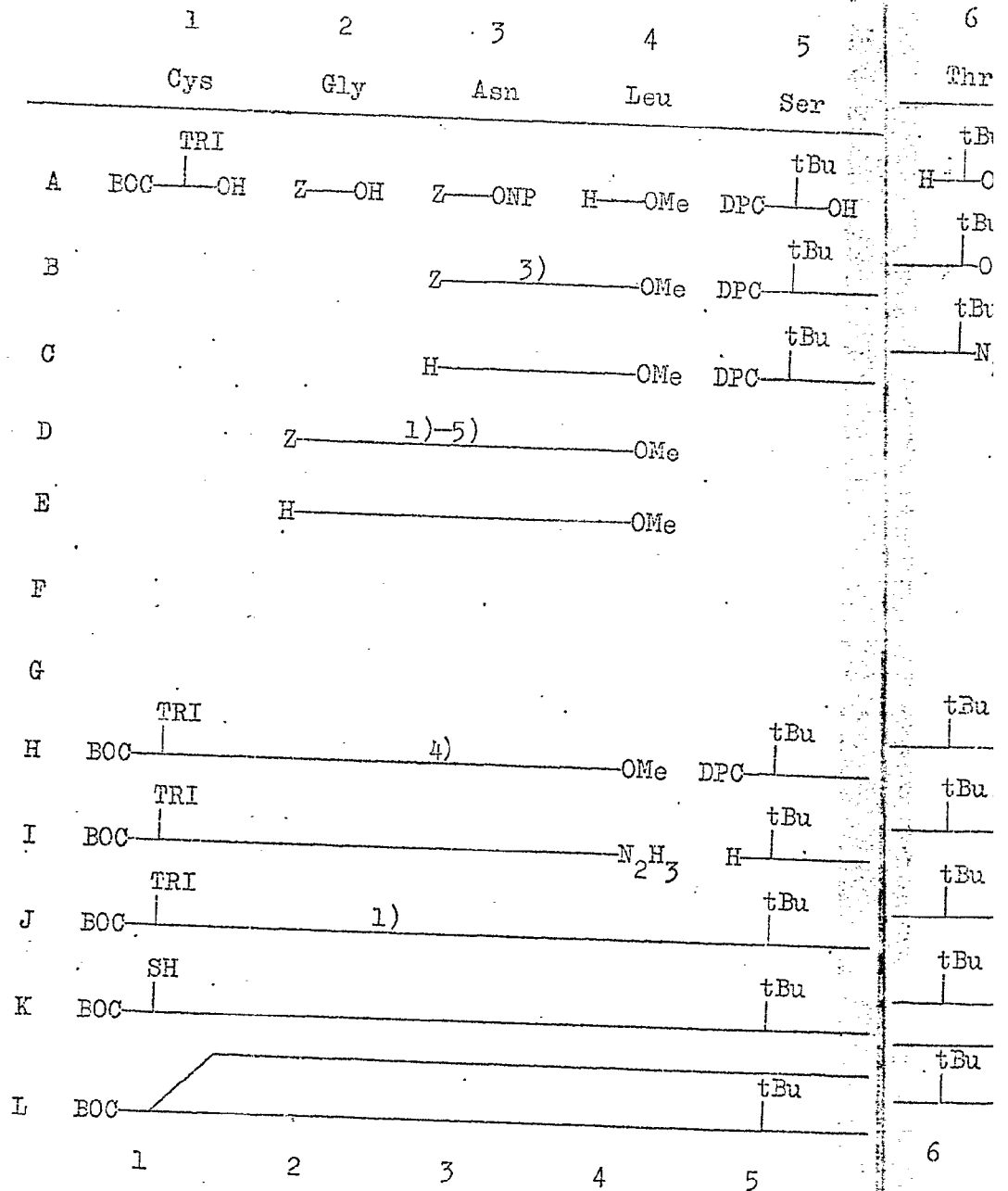
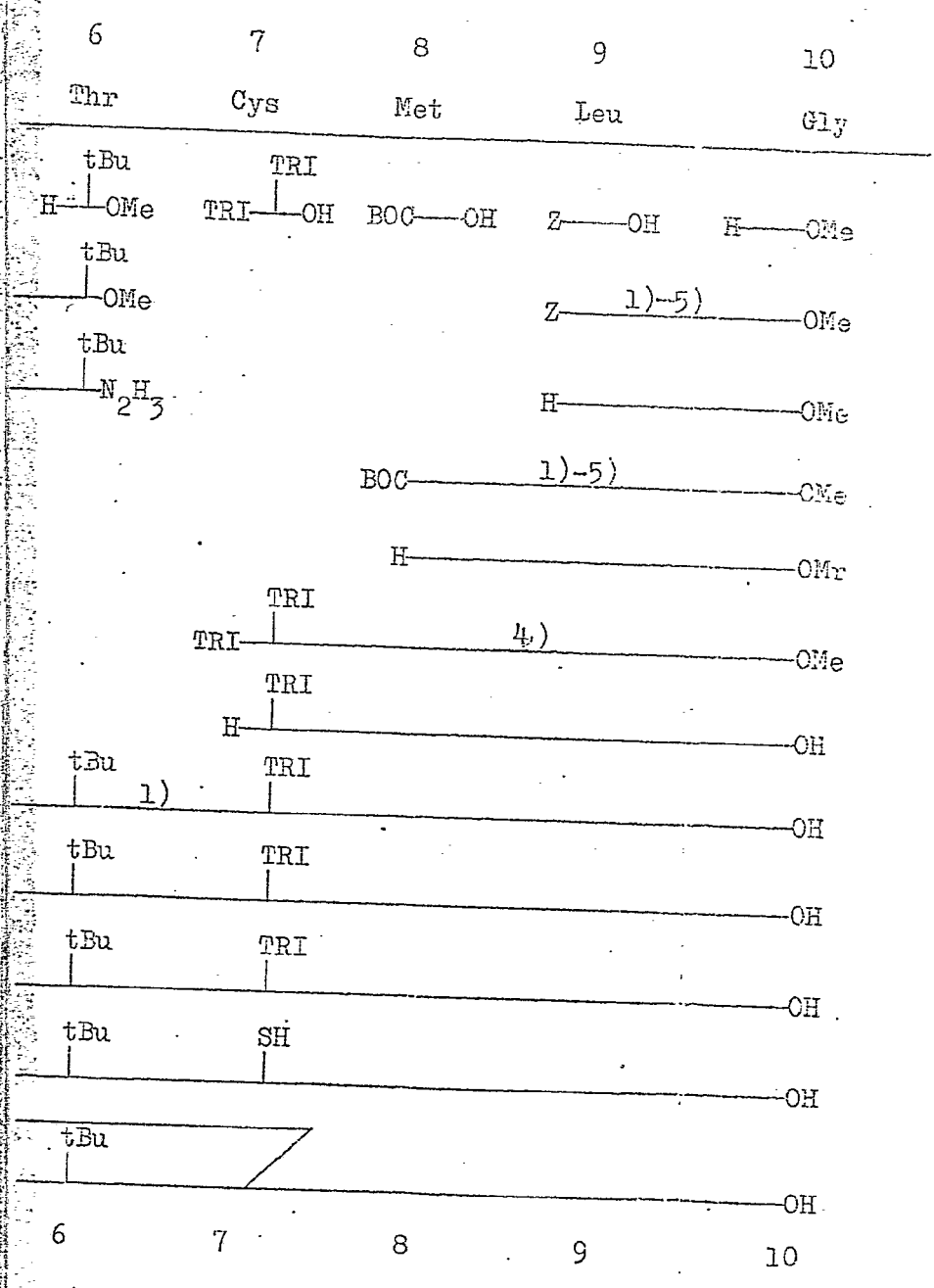
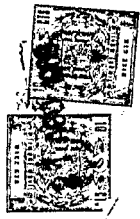


Fig. 3



-28- Bin





- 29 - Per

- 20 -

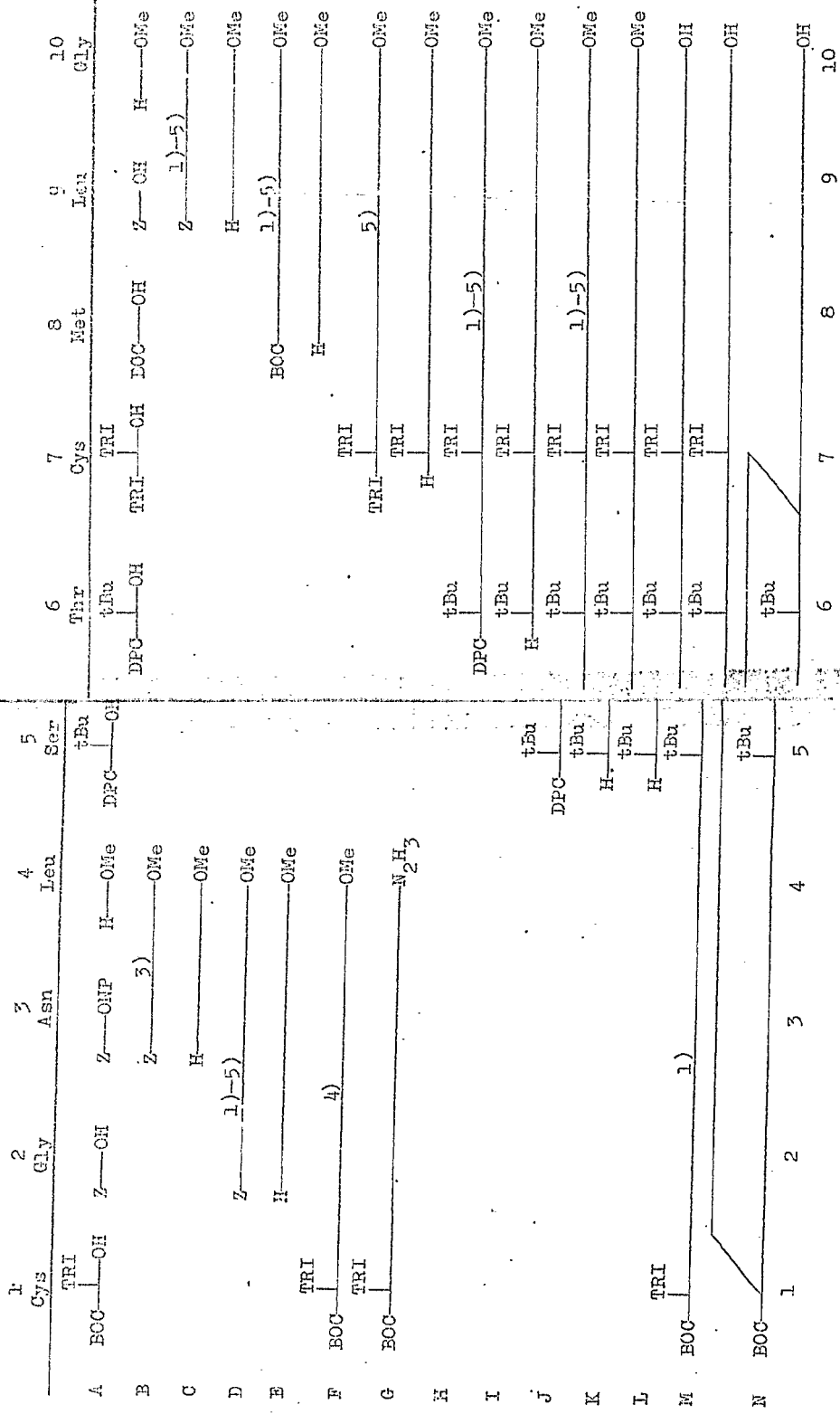


Fig. 4

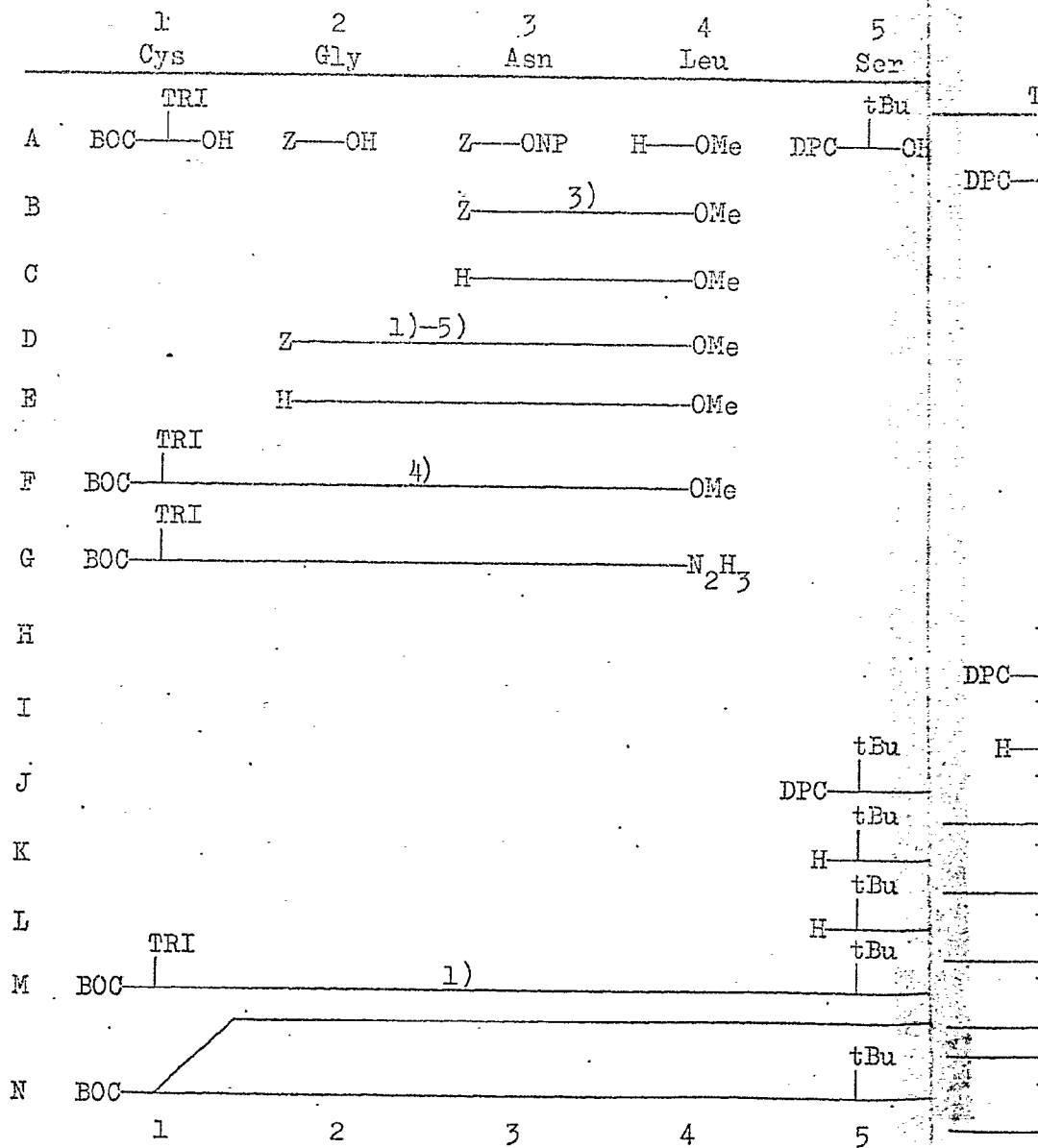
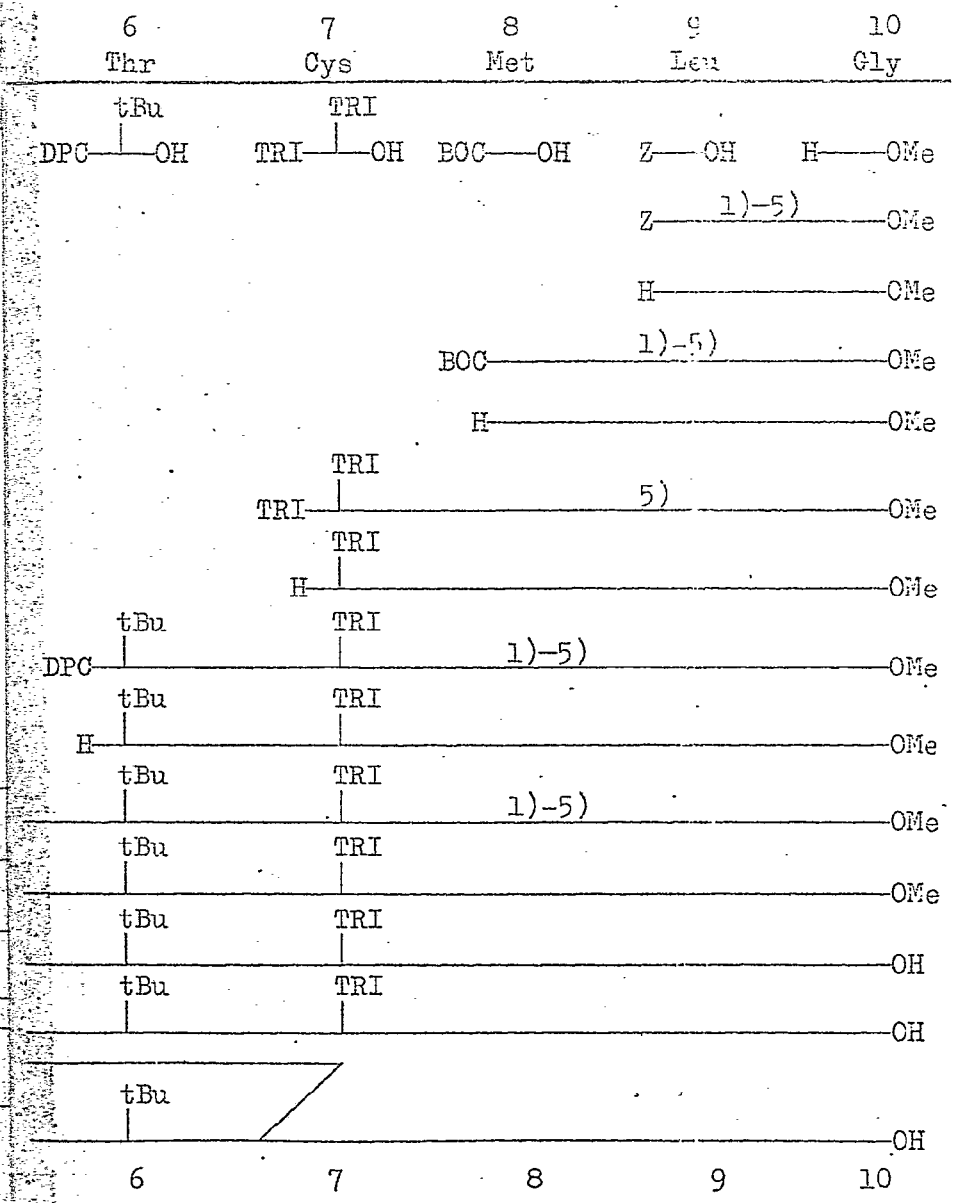
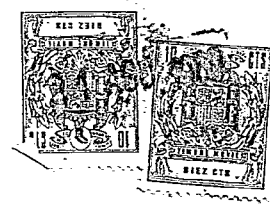


Fig. 4

-29- Bui



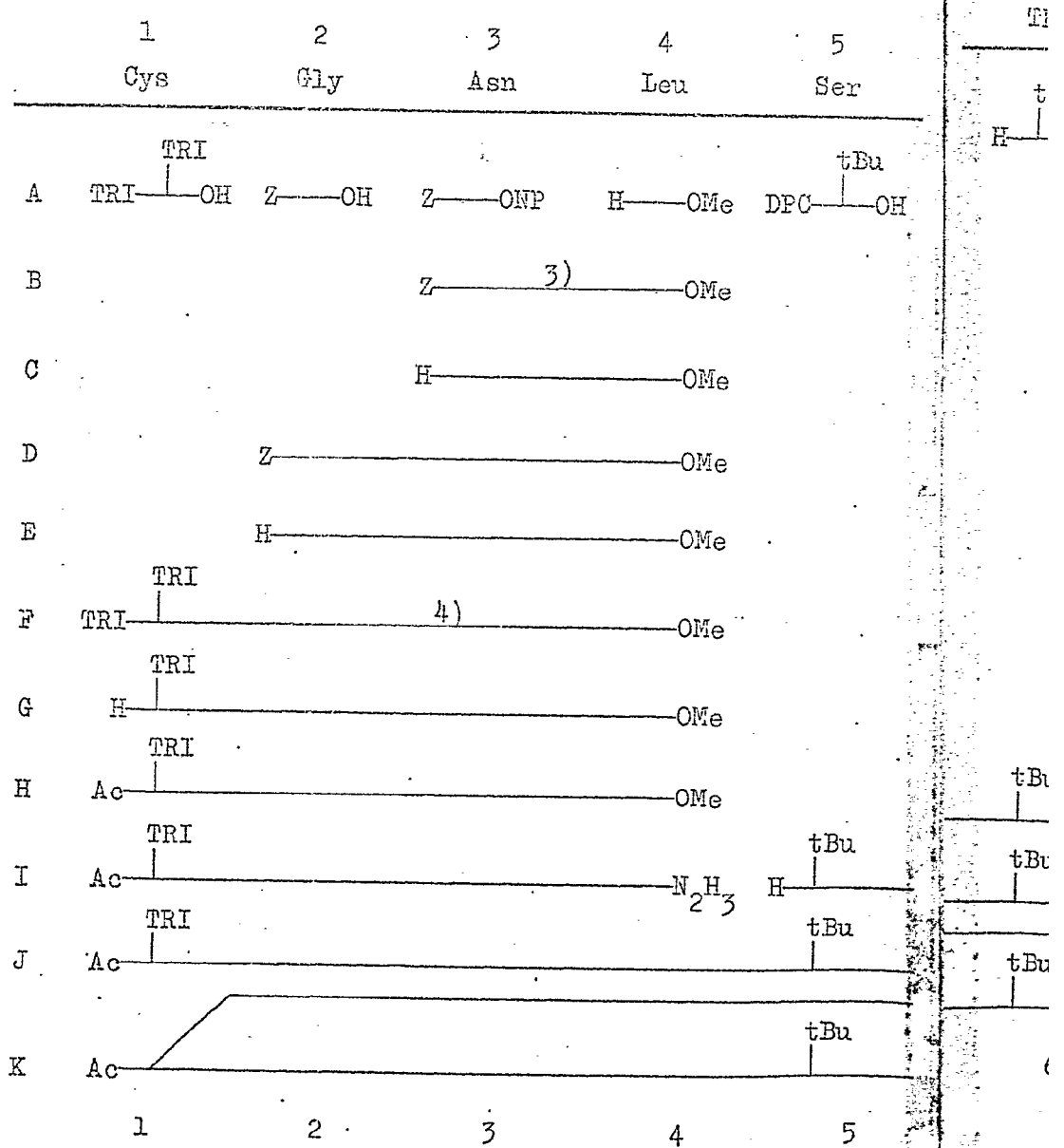
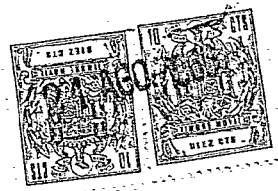
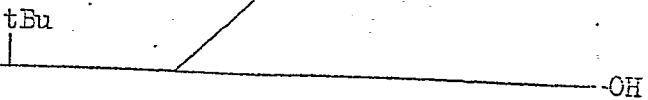
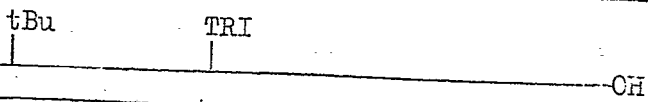
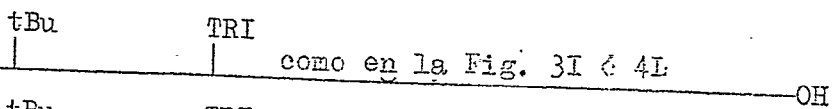
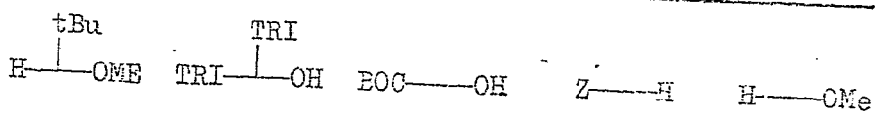


Fig. 5

-30- P₁₁



6 7 8 9 10
Thr Cys Met Leu Gly



6 7 8 9 10



-31- Bis

- 31 -

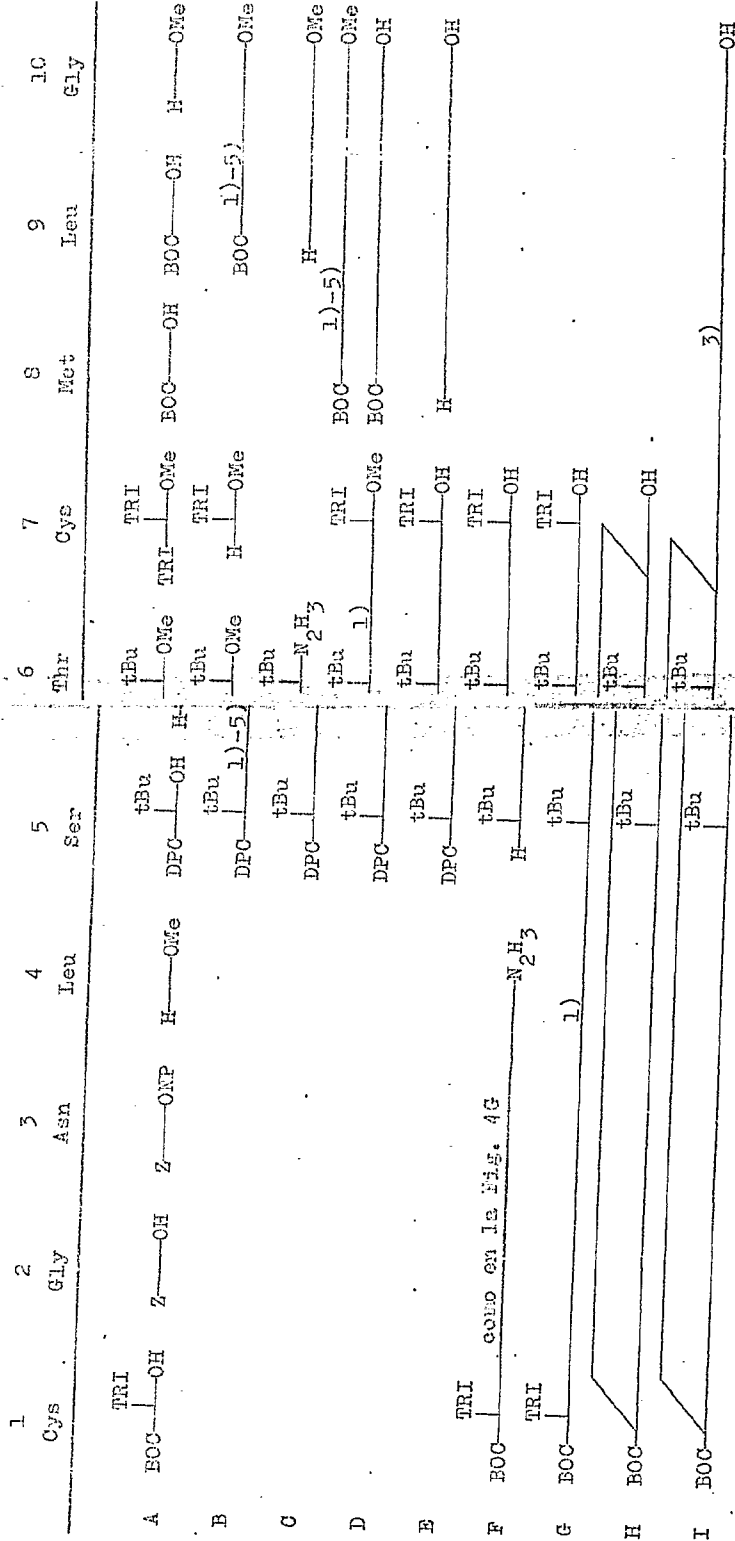


Fig. 6a

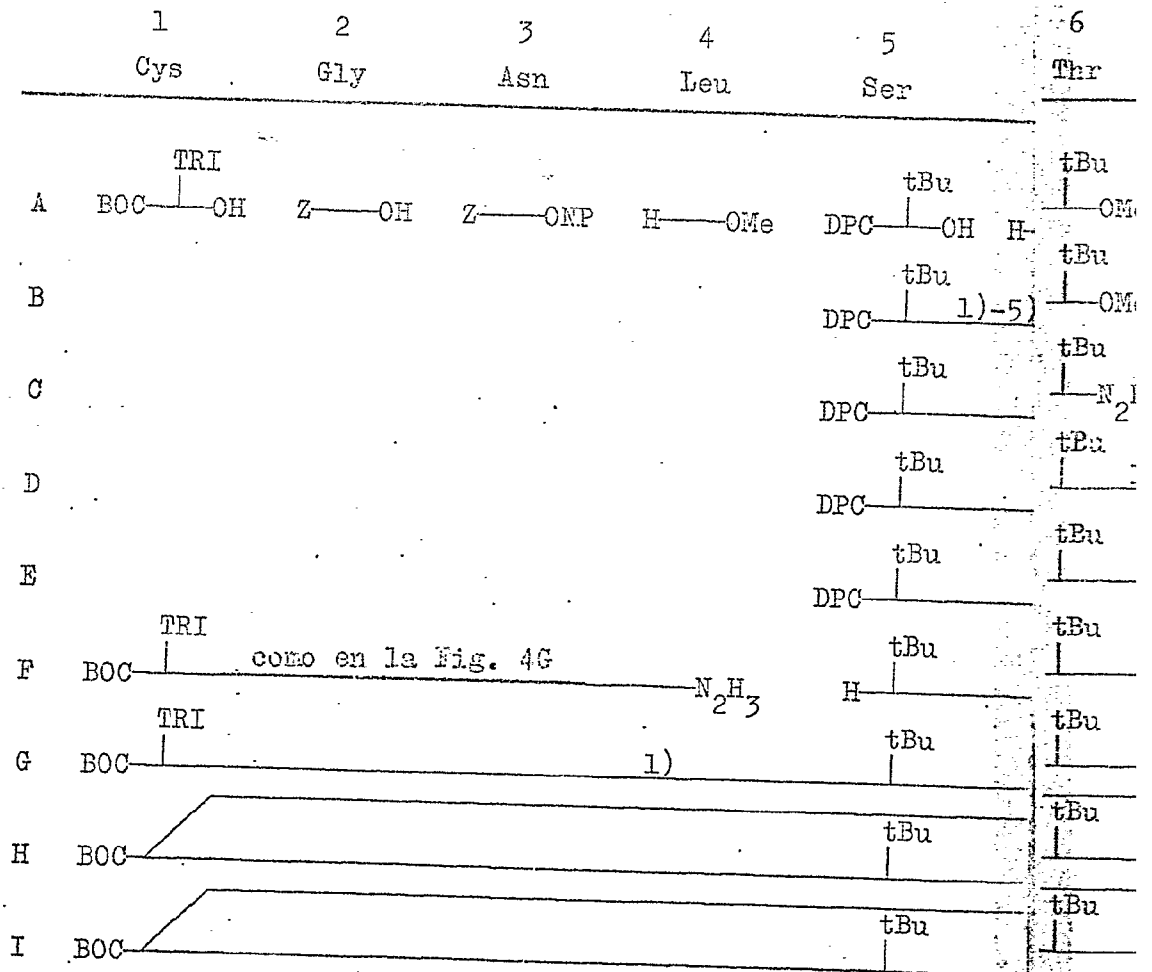
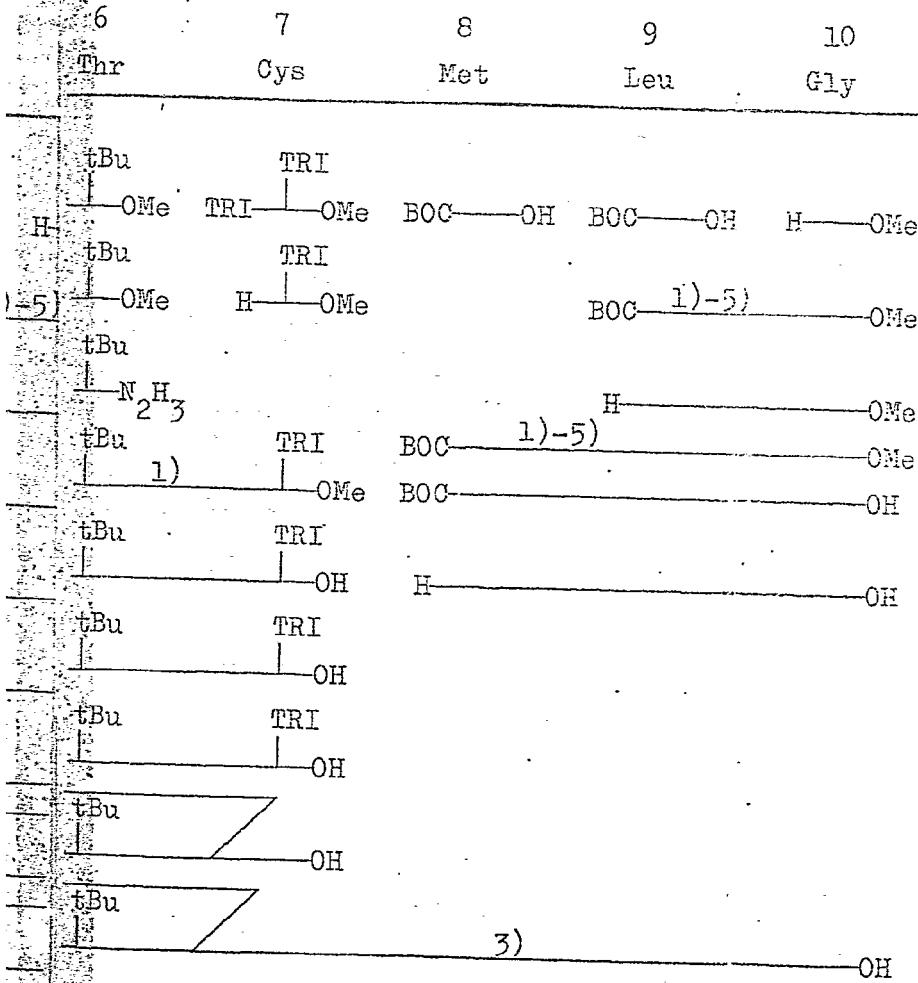


Fig. 6a

-31- Bis



-32- Bz

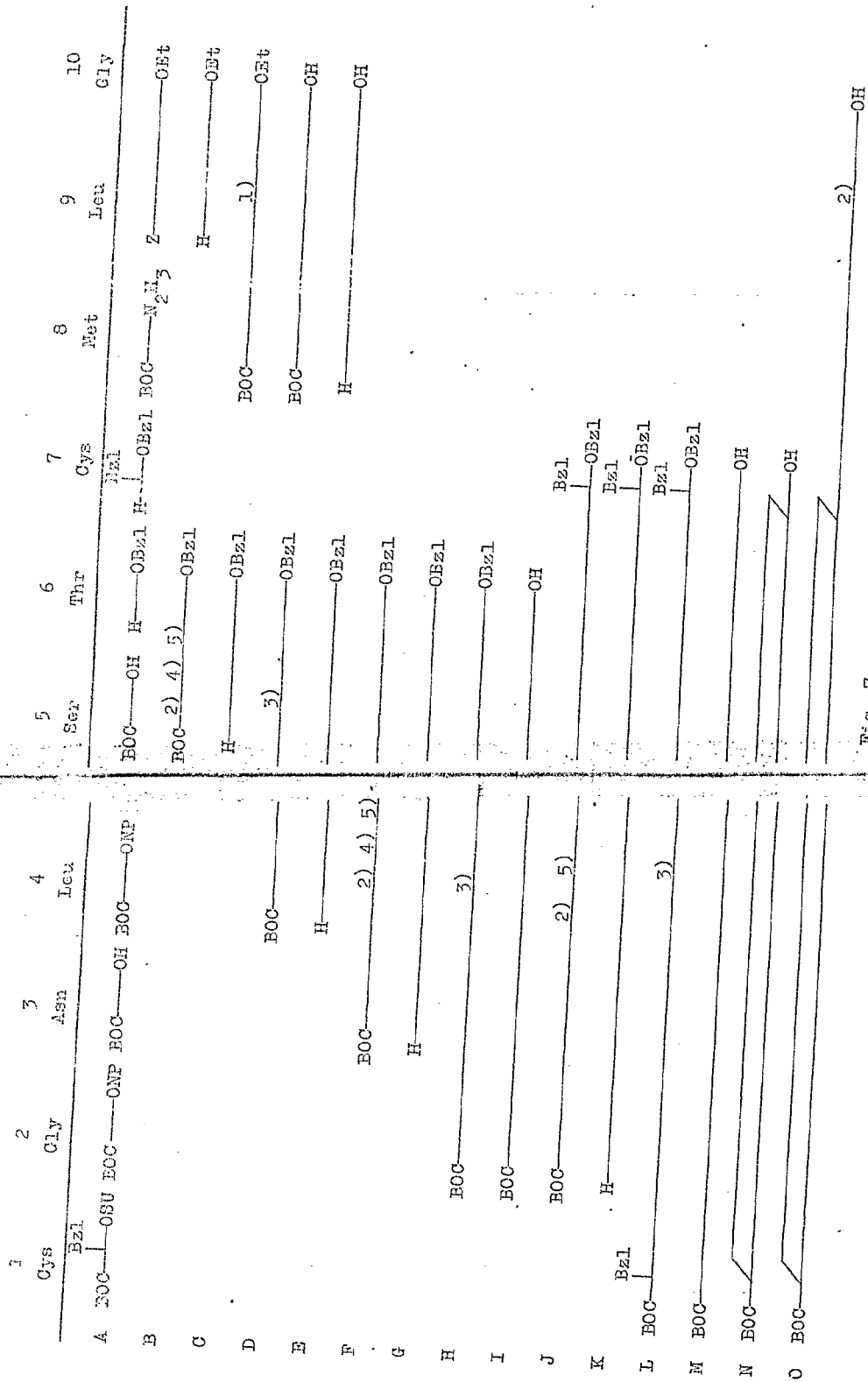


Fig. 7

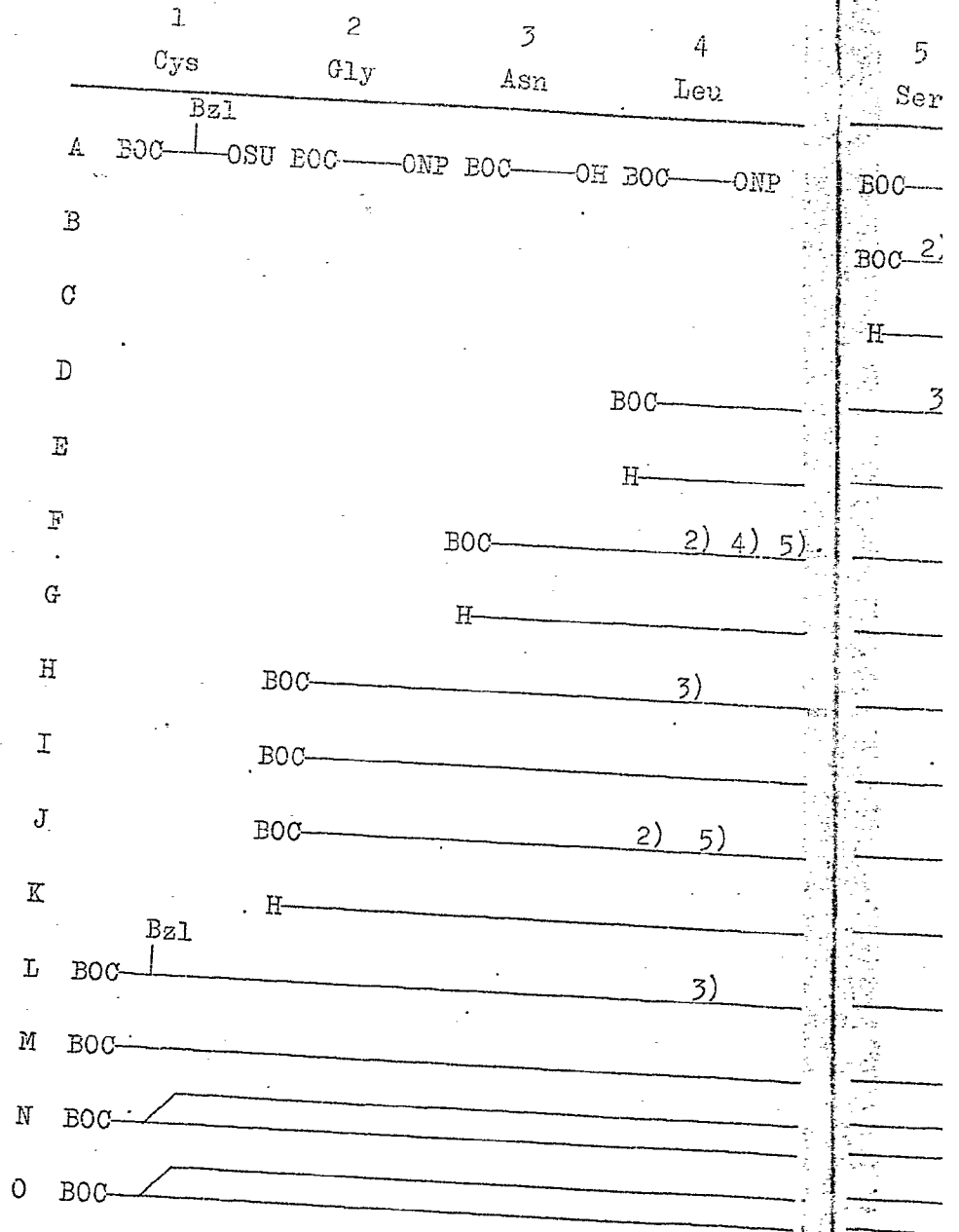


Fig.



-33- Path

-- 33 --

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly
A	Bzl Boc	CSU Boc	ONP Boc	OH Boc	ONP Boc	OH H	Bzl H	N ₂ H ₂ Boc	N ₂ H ₃ Z	OH Cet
B					Boc-2) 4) 5)				H	OMe
C					H			Boc		Cet
D				Boc	3)			Boc		OH
E				H				H		OH
F			Boc	2) 4) 5)						
G			H							
H		Boc		3)						
I		Boc				OH				
J		Boc		2) 5)			Bzl N ₂ H ₂ -Z			
K		H					Bzl N ₂ H ₂ -Z			
L	Bzl Boc						Bzl N ₂ H ₂ -Z			
M	Boc						N ₂ H ₃			
N	Boc						N ₂ H ₃			
O	Boc								1)	OH

Fig. 8

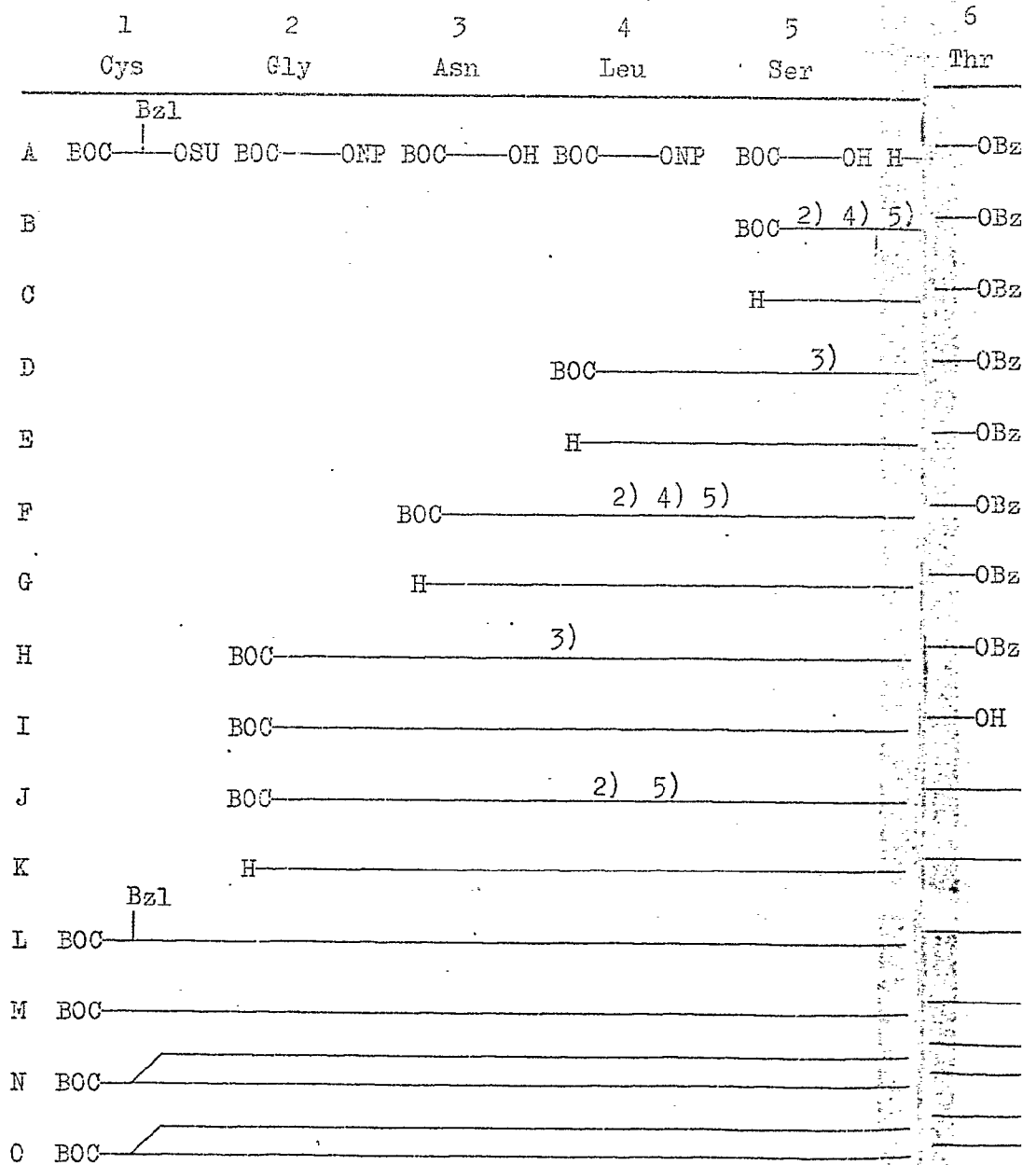
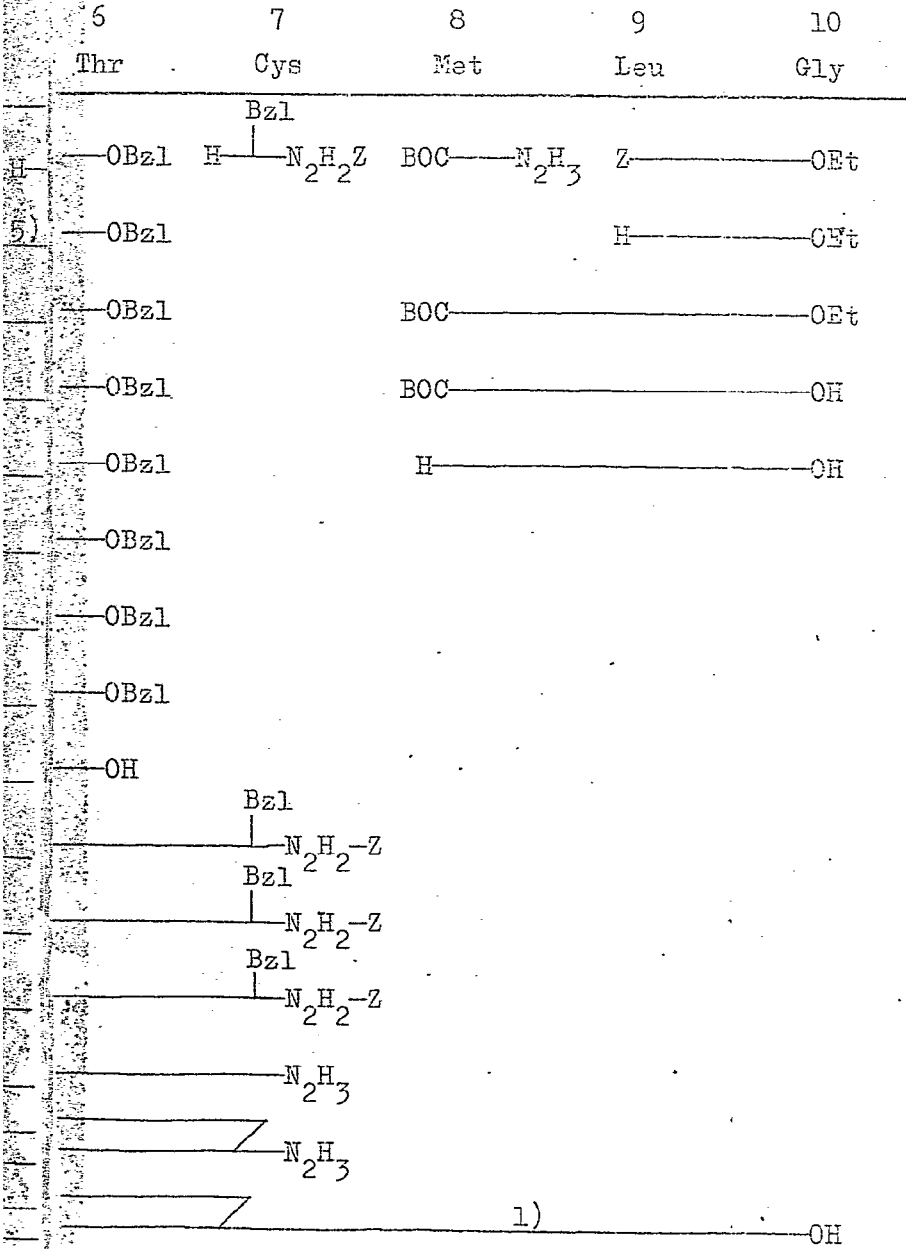
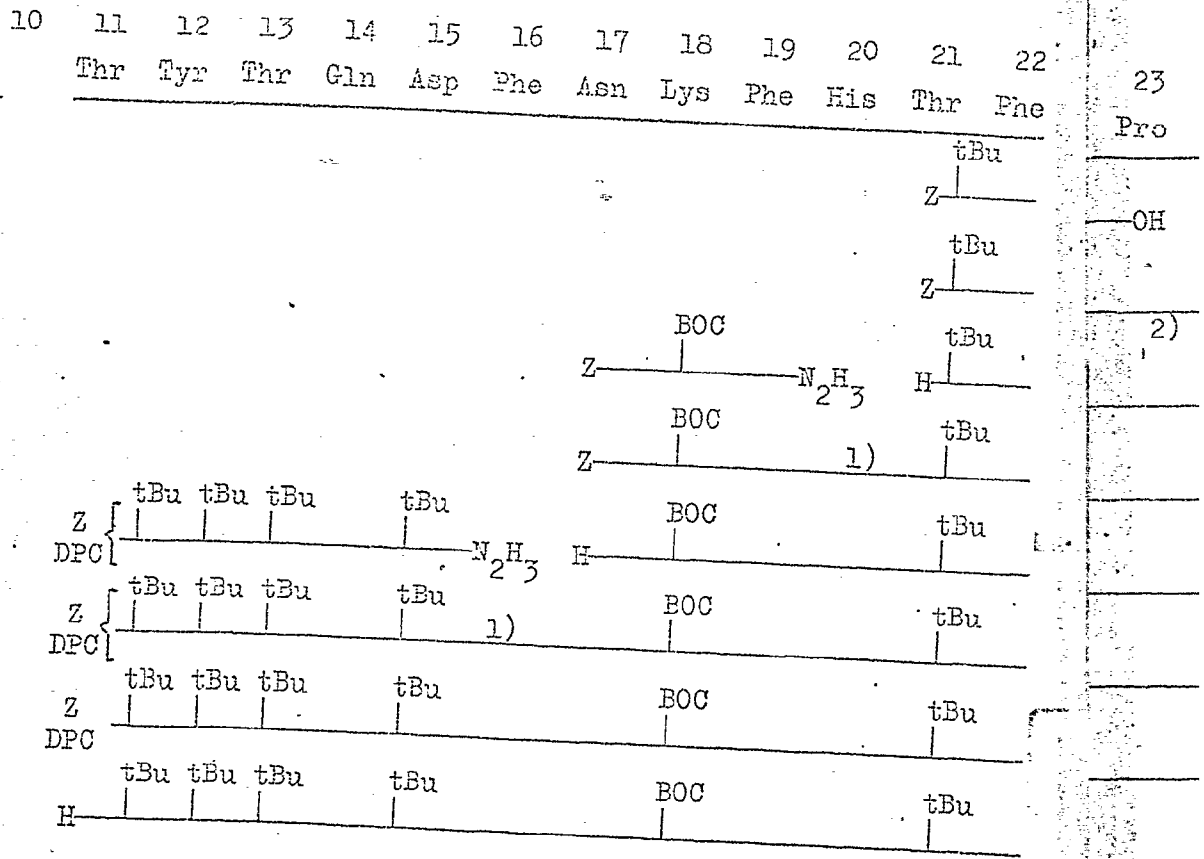


Fig. 8







-35- A₁₄

-- 35 --

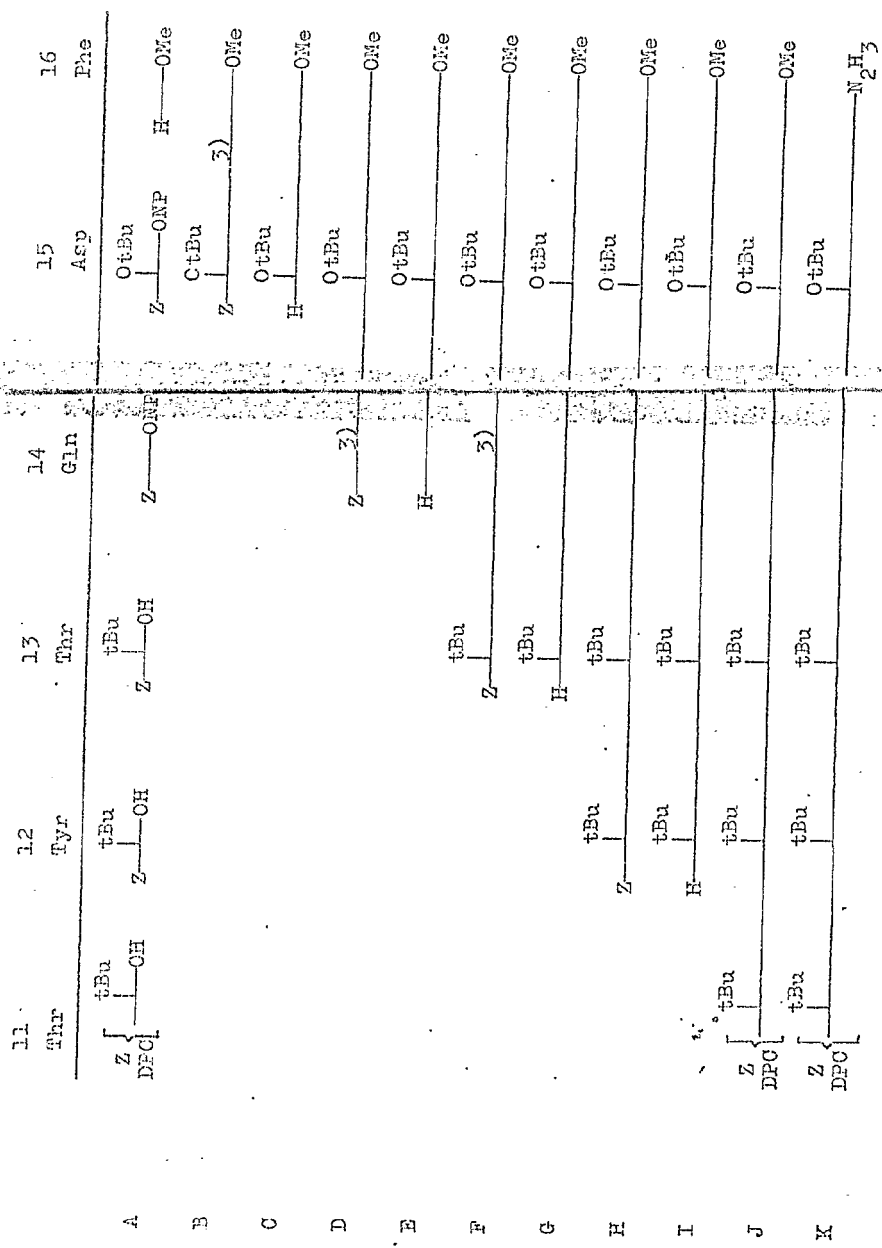


Fig. 10

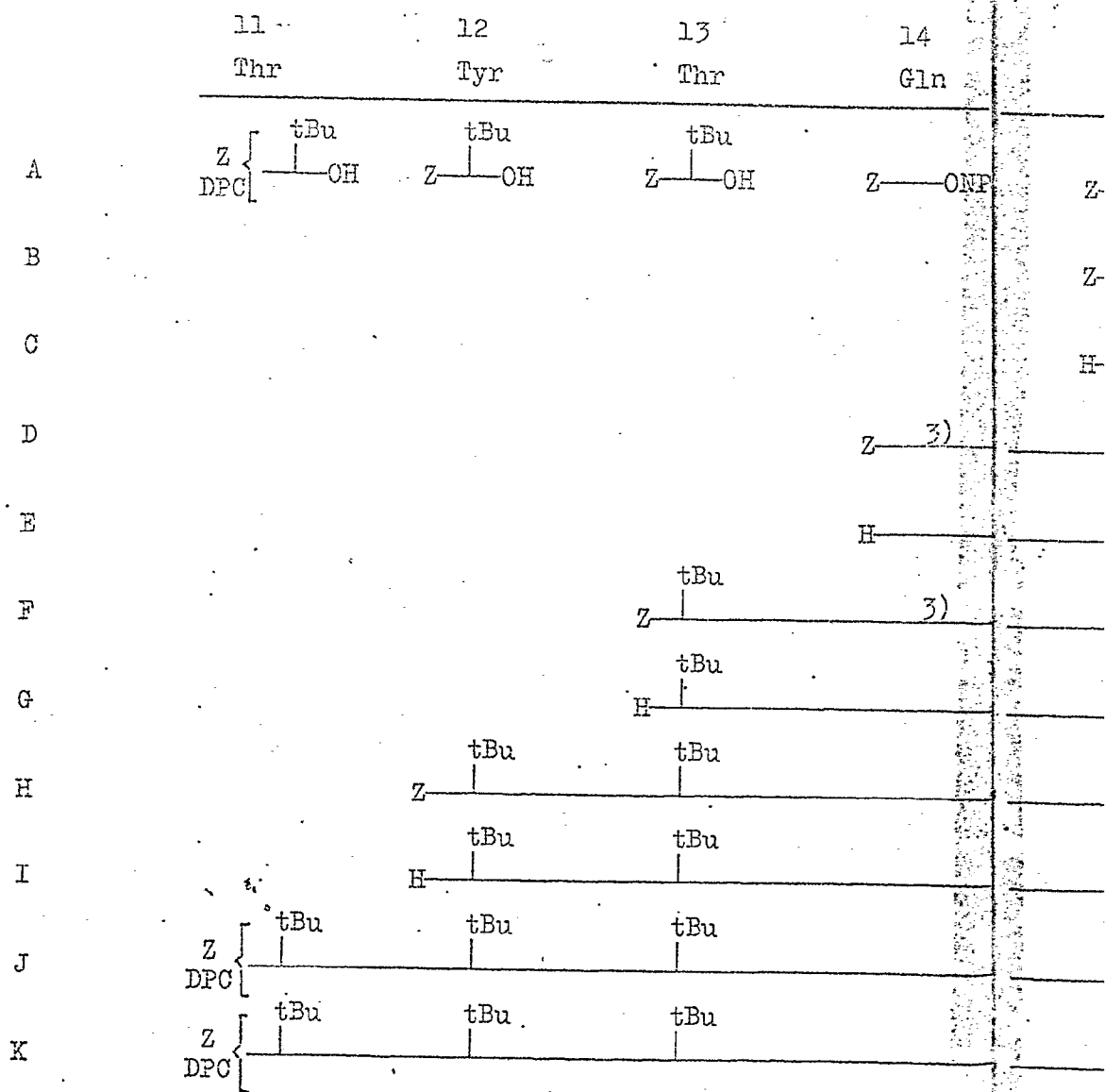
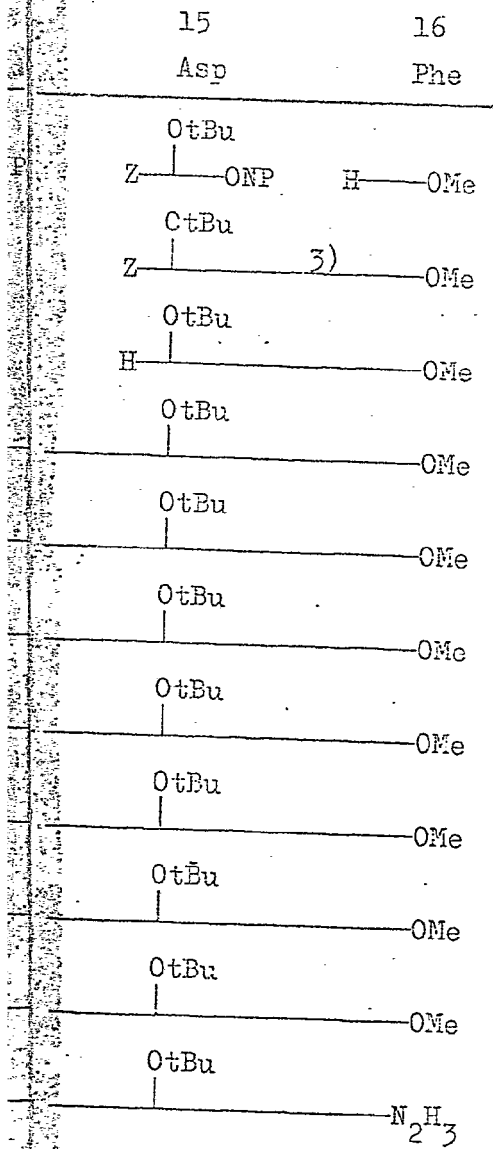


Fig. 10



-35- Pns



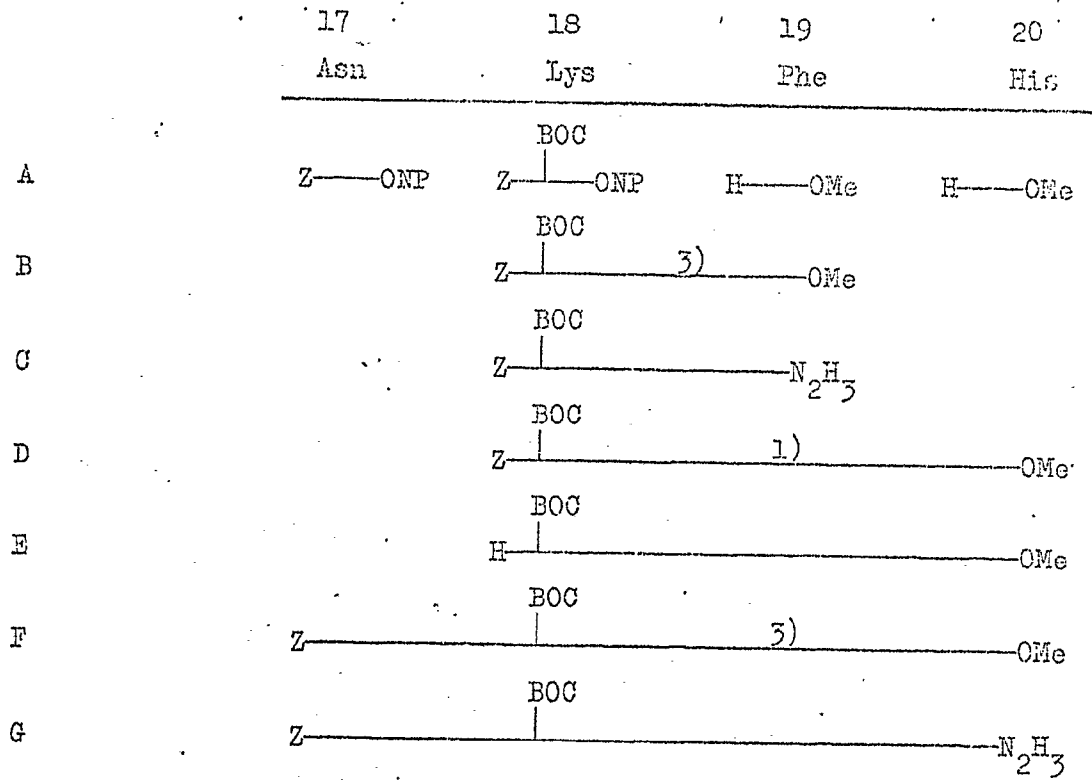


Fig. 11



- 37 - (2a)

-- 37 --

	21	22	23	24	25	26	27	28
	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Ala	Ile	Gly
A	tBu Z- OH	Z- OH	Z- OH	Z- ONP	tBu Z- OH	Z- ONP	Z- OH	H- Ome
B		H- OH	H- OH				Z- 1)-5)	Ome
C	tBu Z- OH	Z- 2)	Z- OH				H- OH	Ome
D						Z- 3)	Z- OH	Ome
E						H- OH	H- OH	Ome
F					tBu Z- OH	Z- 2)	Z- OH	Ome
G					tBu H- OH	H- OH	H- OH	Ome
H					tBu H- OH	H- OH	H- OH	Ome
I					tBu Z- OH	Z- 3)	Z- OH	Ome
J					tBu H- OH	H- OH	H- OH	Ome
K					tBu Z- OH	Z- 2)	Z- OH	Ome
L					tBu H- OH	H- OH	H- OH	Ome

Flk. 12

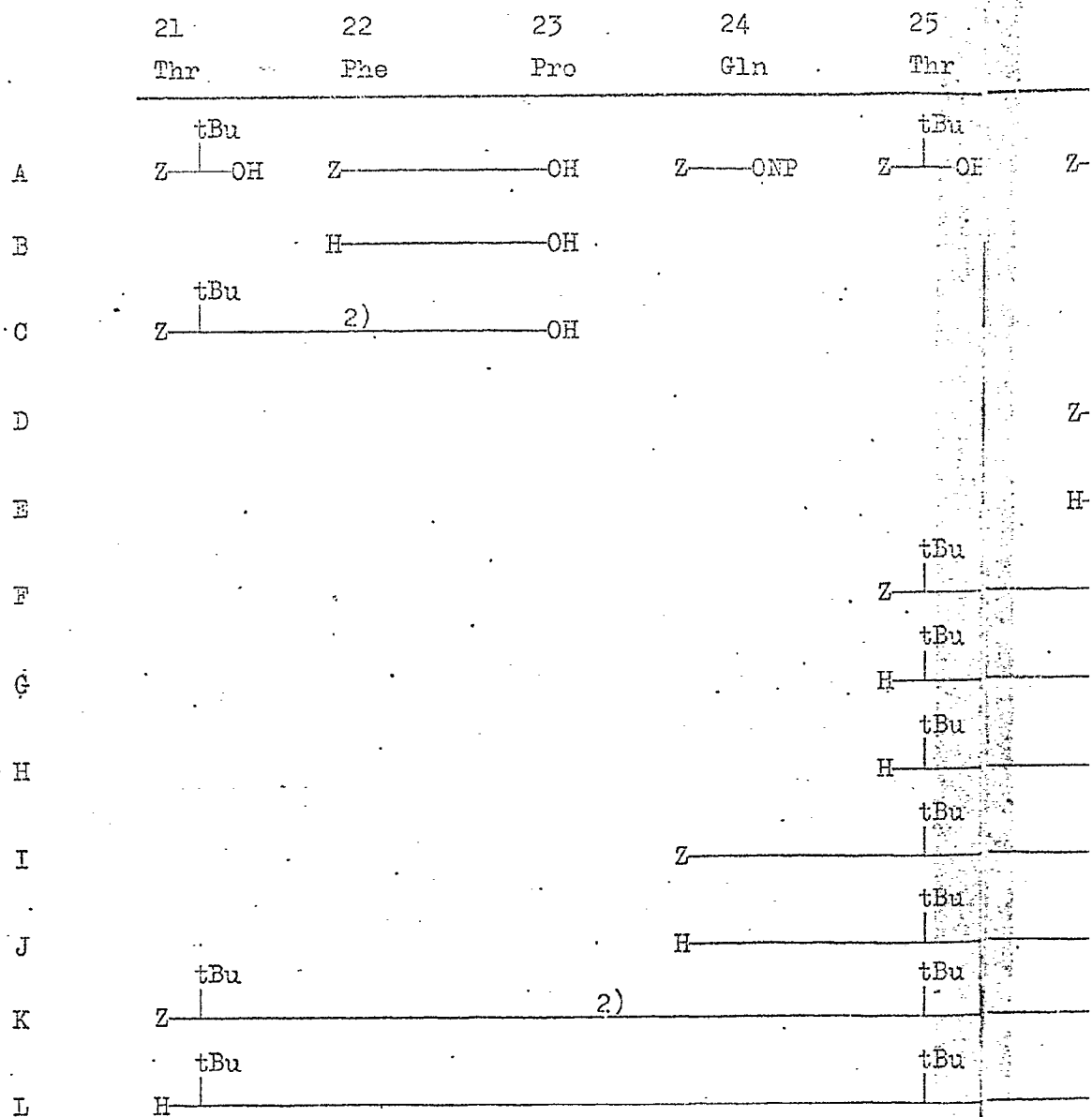
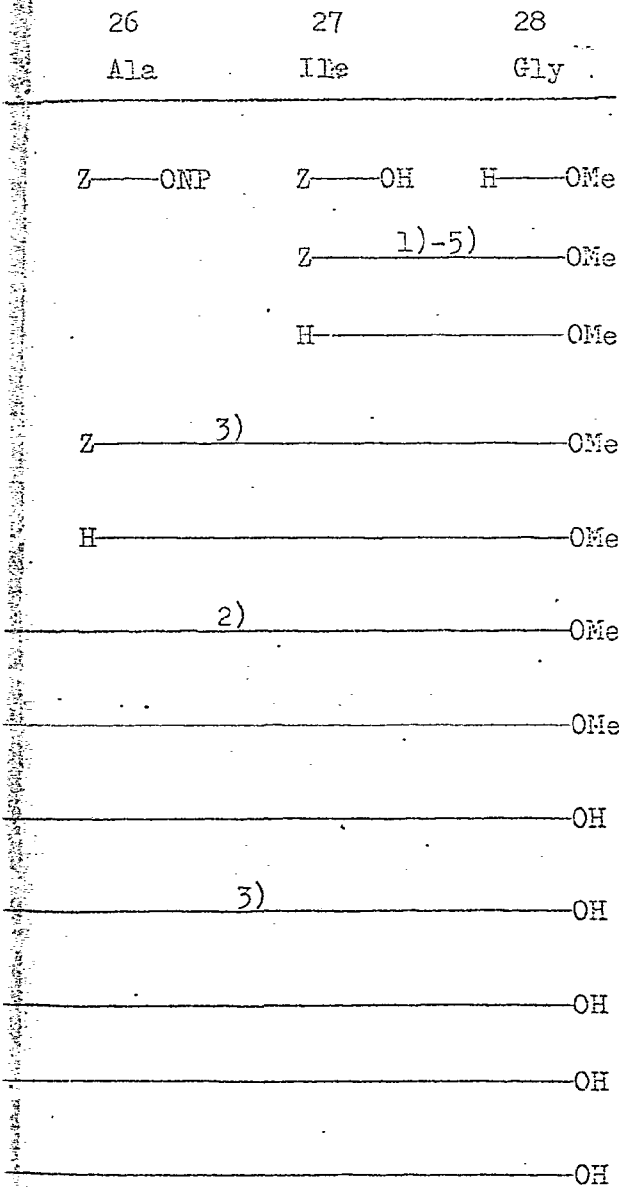


Fig. 12

- 37 - (As)



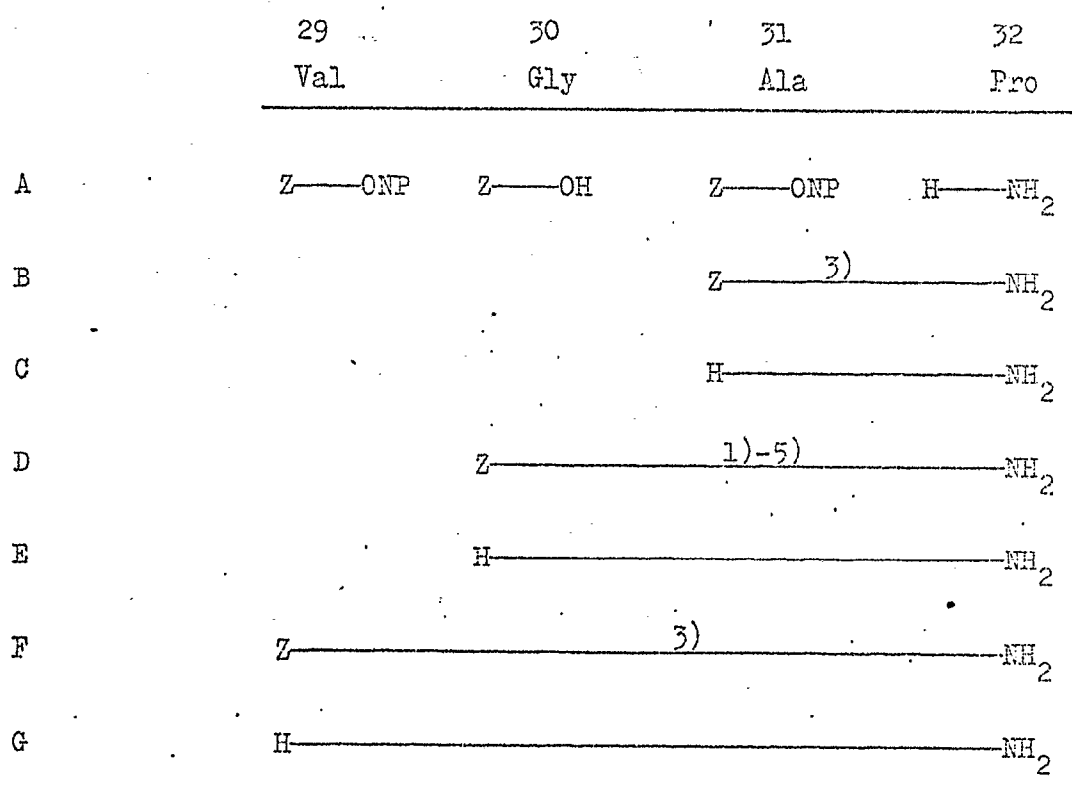


Fig. 13



39- B34

-- 39 --

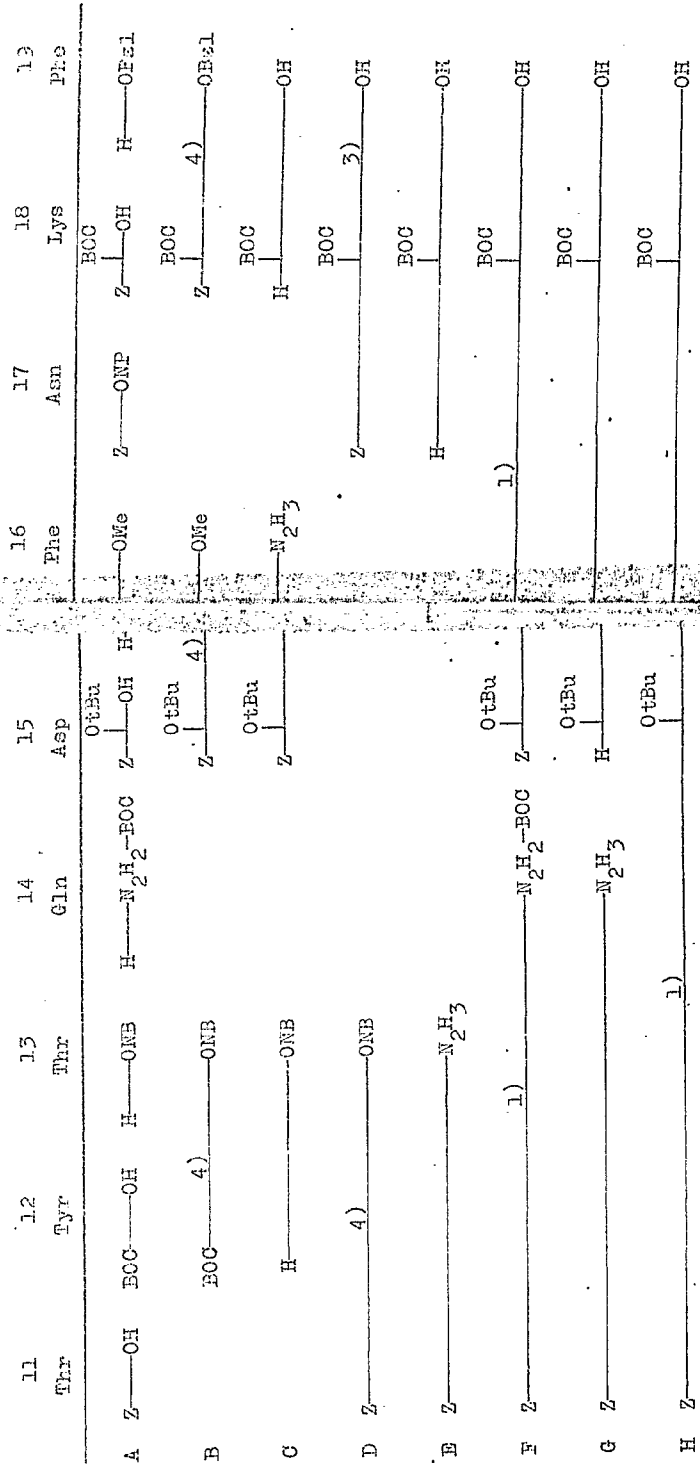


Fig. 14

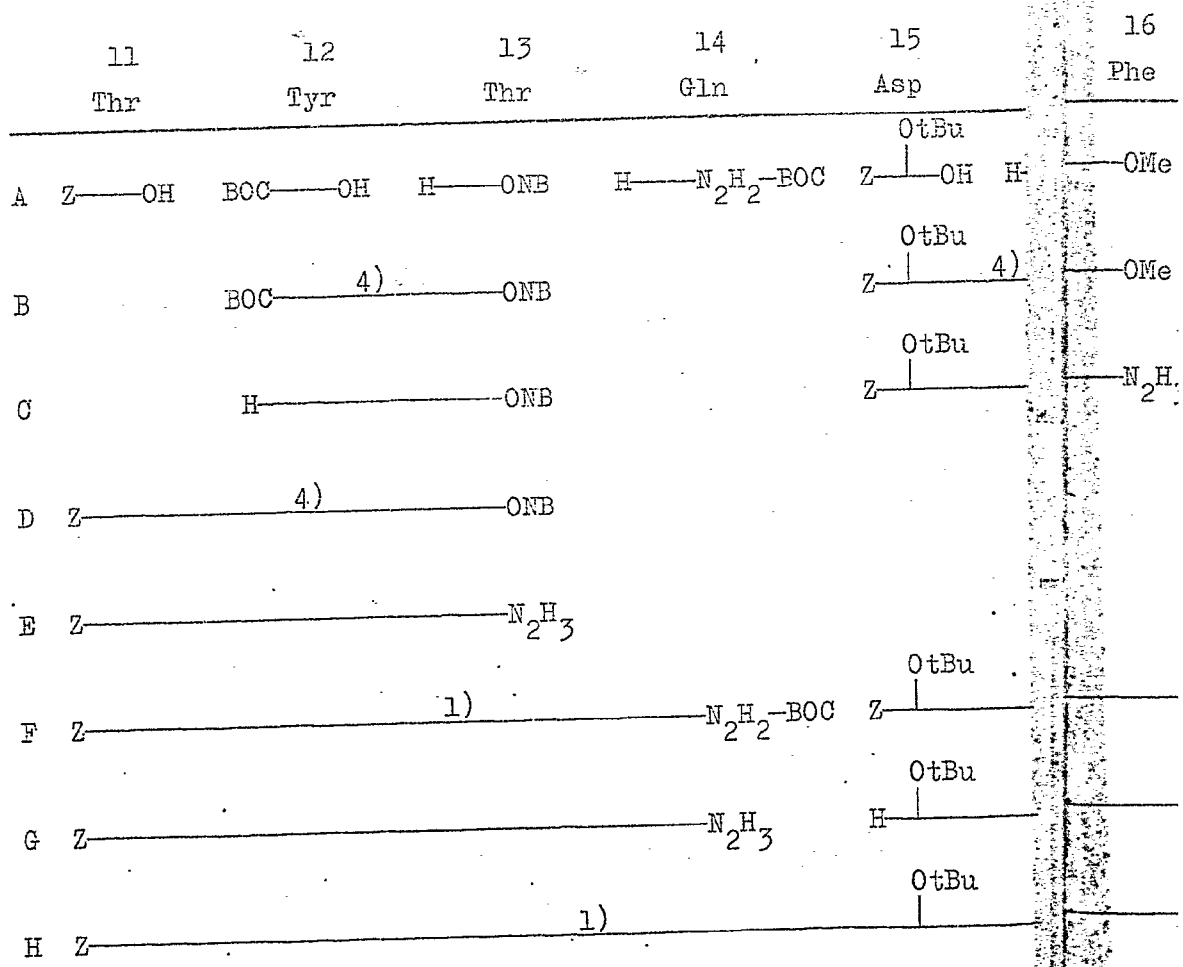
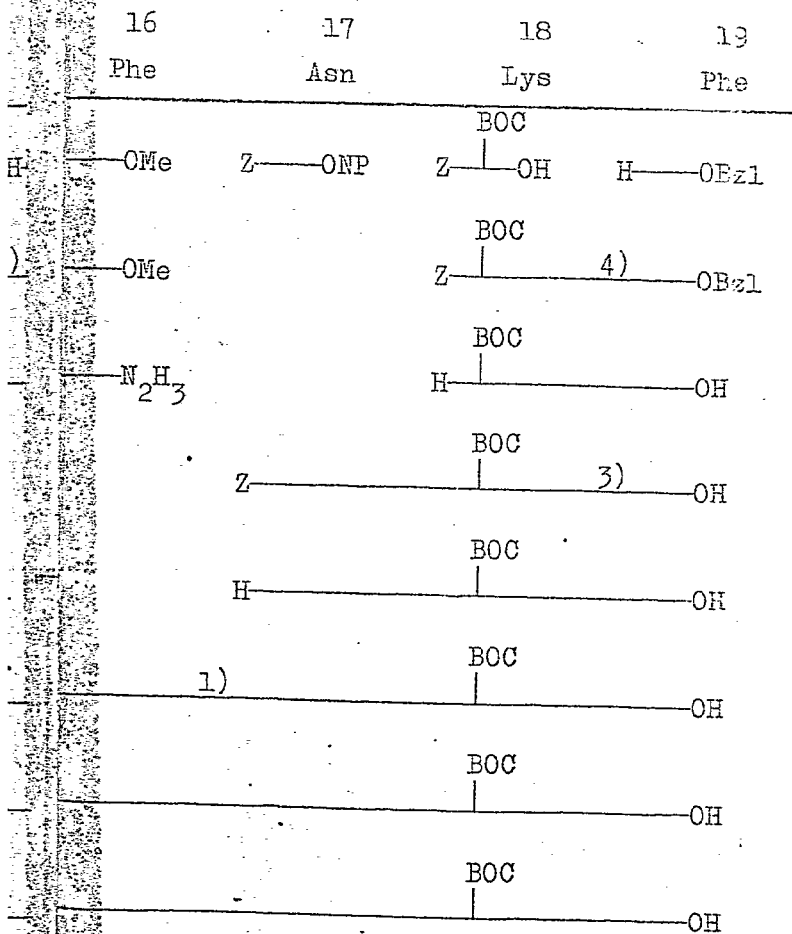


Fig. 14

39- Bin





-40- (84)

- 40 -

	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
	His	Thr	Phe	Pro	Cin	Thr	Ala	Ile	Gly	Val	Gly	Ala	Pro
A	Z-N ₂ H ₃	Z-N ₂ H ₃	Z-ONP	Z-OH	H-N ₂ H ₂ -BOC	BOC-N ₂ H ₃	Z-OH	Z-ONP	H-Ome	Z-ONP	Z-ONP	Z-OH	H-OtBu
B				Z-2)	N ₂ H ₂ -BOC			Z-3)	Ome			Z-2)	OtBu
C				H	N ₂ H ₂ -BOC			H	Ome			H	OtBu
D			Z-3)		N ₂ H ₂ -BOC		Z-		Ome	2)	Z-	3)	OtBu
E			H		N ₂ H ₂ -BOC		H-		Ome		H		OtBu
F		Z-1)			N ₂ H ₂ -BOC	BOC	1)		Ome			3)	OtBu
G		H			N ₂ H ₂ -BOC	BOC			OH	Z-	H		OtBu
H	Z-		1)		N ₂ H ₂ -BOC					Z-2) + NH ₃			NH ₂
I	Z-				N ₂ H ₃					H			NH ₂
J						BOC			2) 4) 5)				NH ₂
K						H							NH ₂
L	Z-					1)							NH ₂
M	H												NH ₂

Fig. 15

	20 His	21 Thr	22 Phe	23 Pro	24 Gln	25 Thr	26 Ala	27 Ile
A	Z-N ₂ H ₃	Z-N ₂ H ₃	Z-ONP	Z-OH	H-N ₂ H ₂ -BOC	BOC-N ₂ H ₃	Z-OH	Z-ON
B				Z- ²⁾ N ₂ H ₂ -BOC				Z-
C				H-N ₂ H ₂ -BOC				H-
D				Z- ³⁾ N ₂ H ₂ -BOC			Z-	
E				H-N ₂ H ₂ -BOC			H-	
F		Z- ¹⁾ N ₂ H ₂ -BOC				BOC-N ₂ H ₂ -BOC	BOC- ¹⁾	
G		H-N ₂ H ₂ -BOC				BOC-N ₂ H ₂ -BOC	BOC-	
H	Z- ¹⁾ N ₂ H ₂ -BOC							
I	Z-N ₂ H ₃							
J						BOC-		
K						H-		
L	Z- ¹⁾							
M	H-							

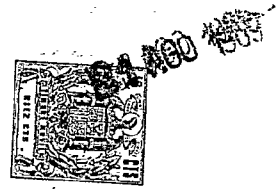
Fig. 15



Ejemplo 1

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-
Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-
Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (Calcitonina M)

5. 150 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys-(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se disuelven en 3 cc de ácido trifluoroacético al 95 %, se enjuaga con nitrógeno y se deja reposar
10. durante 90 minutos a 25^o. El trifluoroacetato de la dotriscontapéptido-amida liberado se precipita entonces mediante adición de 60 cc de éter absoluto y libre de peróxido como polvo amorfo, se separa por centrifugación, se suspende en 10 cc de éter recién preparado, se vuelve a centrifugar, y
15. el residuo se seca a 30^o. Para la transformación en el acetato se disuelve el trifluoroacetato en 3 cc de agua y se filtra a través de una columna equilibrada con ácido acético 0,02-N de intercambiadores de iones débilmente básicos (por ejemplo, Merck nº II; Ø = 7,5 mm; l = 20 cm). Se lava
20. con ácido acético 0,02-N hasta que la reacción de Folin sea negativa, el eluado se concentra a un volumen de aproximadamente 5 cc, se filtra a través de una columna de Bio-Gel P 6, se equilibra en ácido acético 0,1-N (volumen del lecho de gel = 200 cc). El eluado se analiza cromatográficamente
25. en capa delgada (Alox, sistema 52). Las fracciones principales (máximo en aproximadamente 100.- 120 cc) se reúnen, se concentran por evaporación en el evaporador rotativo (temperatura interior no superior a 20^o) hasta sequedad, se vuel



- ve a disolver en 5 cc de agua y se liofiliza. El producto así obtenido se somete, para su limpieza definitiva a una distribución según Craig a través de 500 escalones en el sistema de disolventes n-butanol-ácido acético glacial-agua (4:1:5, vol.) con volúmenes de fases de cada vez 3 cc. De los elementos de distribución nº 141-180 (max. en nº 162; K = 0,48) se aisla, al concentrar por evaporación hasta sequedad (evaporador rotativo, temperatura interior máximo 20°), disolución en ácido acético 0,1-N y liofilización el dotriscontapéptido-amida, cromatografica y electroforéticamente unitario, como polvo blanco, amorfo.

En el cromatograma de capa delgada muestra los siguientes valores Rf:

- | | | |
|-----|---|------------------------------------|
| | sobre "Alox" D-O (Fa. Camag; | Rf (52) = 0,56 |
| 15. | óxido de aluminio con un 8 %
de yeso) | Rf (79) = 0,66
Rf (45) = 0,45 |
| | sobre celulosa "Selecta" 1440
(de la Fa. Schleicher und
Schuell, placas terminadas) | Rf (45) = 0,51
Rf (101A) = 0,60 |

20. Electrofóresis sobre celulosa "Selecta" 1440
pH 1,9, 1½ horas, 280 V:
trayecto de recorrido = 3,5 cm hacia el cátodo,
pH 7,1, 1½ horas, 280 V:
trayecto de recorrido = 1,3 cm hacia el cátodo

25.

El producto de partida se puede preparar como sigue:

1. Z-Asn-Leu-OMe

16,7 g de H-Leu-OMe y 46,0 g de Z-Asn-ONP se di-



5. seuelven en 100 cc de dimetilformamida recién destilada. La solución se deja reposar durante 19 horas a 25°. Después se agregan 1,2 litros de agua, el precipitado cristalino se filtra en vacío. El derivado dipéptido se seca en vacío a 40° y después se recristaliza dos veces en metanol-agua. P.f. 180-181°; $[\alpha]_D^{20} = +9^\circ$ (c = 2,05 en cloroformo)

2. H-Asn-Leu-OMe

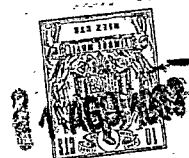
10. 15,0 g de Z-Asn-Leu-OMe se disuelven en 400 cc de t-butanol-agua (9:1) y se hidrogena en presencia de 2 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la hidrogenación se separa el catalizador por filtración en vacío y se evapora a 40°. El residuo se sigue empleando directamente.

3. Z-Gly-Asn-Leu-OMe

15. 4,4 mMol de H-Asn-Leu-OMe se disuelven en 15 cc de dimetilformamida y después se agregan 5,5 mMol de Z-Gly-p-nitrofeniléster. La solución amarilla, clara, se deja durante 18 horas a 27°. Después se evapora en alto vacío a 40°, se seca, el residuo se mezcla con éster acético, con lo que cristaliza. Después de 1 hora a 0° se filtra en vacío y se seca. Después se vuelve a suspender el producto de nuevo en 25 cc de éster acético, se frota, se filtra en vacío y se seca; p.f. 154°.

4. H-Gly-Asn-Leu-OMe

25. 1,3 g de Z-Gly-Asn-Leu-OMe se disuelven, bajo calentamiento, en 100 cc de metanol y la solución, enfriada a temperatura ambiente, se hidrogena en presencia de 0,3 g



de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la recepción de hidrógeno se separa del catalizador por filtración en vacío y se evapora hasta sequedad. Se obtienen así 760 mg de H-Gly-Asn-Leu-OMe en forma amorfa.

5. 5. BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe

- 710 mg de H-Gly-Asn-Leu-OMe y 1,36 g de BOC-Cys (TRI)-OH se disuelven en 12 cc de acetonitrilo y la solución enfriada a 0° se mezcla con 820 mg de dicitclohexilcarbodiimida. Después de 30 minutos a 0° y 60 horas a 28° se separa por filtración en vacío de la dicitclohexilurea y el filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se mezcla con éter de petróleo, se frota, se vierte la solución de éter de petróleo y el producto insoluble se recoge en éster acético. La solución éster acética se lava a 0° con solución diluida de ácido cítrico, agua, solución de bicarbonato sódico y agua, se seca con sulfato sódico y se evapora. El derivado tetrapéptido, obtenido como resina incolora, se vuelve a precipitar, para su limpieza, de acetona-éter. Rendimiento: 1,2 g de polvo, que, según la cromatografía de capa delgada el gel de sílice, es unitario; Rf = 0,39 en el sistema cloroformo-metanol (9:1).
- 10.
- 15.
- 20.

6. BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NHNH₂

- 988 mg de BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe se disuelven en 20 cc de metanol y a la solución, enfriada a 0°, se agregan 2 cc de hidrato de hidrazina. Después de 14 horas a 2° se agregan 200 cc de ácido acético 0,5-N, frío como el hielo, el precipitado obtenido se frota a fondo, se fil-
- 25.



5. tra en vacío, se lava neutro con agua de hielo y se seca durante la noche en el secador de vacío. El BOC-Cys(THI)-Gly-Asn-Leu-hidrazida en bruto se limpia disolviendo y precipitando dos veces en metanol-agua. En la cromatografía de capa delgada en placas de gel de sílice es el $R_f = 0,3$ en el sistema cloroformo-metanol (9:1).

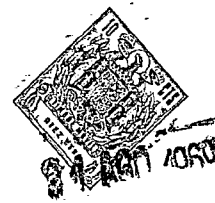
7. BOC-Met-Leu-Gly-OMe

10. 5 g de Z-Leu-Gly-OMe (J. Am. Chem. Soc. 78, 2126 (1956)) se disuelven en 200 cc de metanol y la solución, enfriada a 0° , se hidrogena en presencia de 1 g de carbón de paladio (10 % de Pd) bajo intensa agitación a 0° . Terminada la hidrogenación se separa del catalizador por filtración en vacío y el filtrado se evapora en vacío a una temperatura del baño de 25° .

15. El residuo oleinoso se mezcla, sin secar, con 4 g de BOC-metionina y la mezcla se disuelve en 100 cc de acetonitrilo. Después se concentra por evaporación en vacío a un volumen de 60 cc, se enfría a 0° y se agregan 4,5 g de dicitclohexilcarbodiimida. Después de desgasificar con nitrógeno se deja durante 30 minutos a 0° y durante 18 horas a 25° . Después se separa la dicitclohexilúrea precipitada por filtración en vacío y el filtrado se concentra hasta sequedad. El residuo se lava bajo frotación con éter de petróleo se vierte la solución de éter de petróleo y el producto insoluble se seca. Después se disuelve en éster acético y la solución se lava con solución diluida de ácido cítrico, agua, solución de bicarbonato sódico y agua, se seca con

20.

25.



sulfato sódico y se evapora. El residuo se disuelve, para su limpieza, en la cantidad mínima de acetone libre de peróxido y se precipita mediante adición de éter libre de peróxido; se obtiene así el derivado tripéptido BCC-Met-Leu-Gly-OMe como polvo sólido.

8. H-Met-Leu-Gly-OMe

3 g del derivado tripéptido obtenido bajo 7) se mezclan con 60 cc de HCl 0,4-N en éster acético y la mezcla de reacción se deja durante 90 minutos a 25°. Después se evapora hasta sequedad y el residuo (H-Met-Leu-Gly-OMe-hidrocioruro) se seca durante 24 horas a 0,01 Torr sobre sosa cáustica.

9. TRI-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe

1,23 g de H-Met-Leu-Gly-OMe, HCl y 1,43 g de TRI-Cys(TRI)-OH se mezclan con 15 cc de acetonitrilo y 300 mg de N-metilmorfolina. Después de enfriar a 0° se agregan 800 mg de dicitohexilcarbodiimide y la mezcla de reacción se agita durante 1 hora a 0° y durante 45 horas a 30° bajo nitrógeno. Después se filtra, el filtrado se evapora en vacío hasta sequedad y el residuo se frota con éter de petróleo. Se vierte la solución de éter de petróleo, el residuo se seca y se disuelve en éster acético. La solución éster acética se lava a 0° con solución de ácido cítrico, agua, bicarbonato sódico y agua, se seca con sulfato sódico y se evapora. Para su limpieza se disuelve el producto en bruto (resina débilmente amarillenta) en la menor cantidad posible de metanol y la solución se cromatografía en una colum-



no preparada en metanol de Sephadex LH-20 (2,5 + 90 cm). Se recogen fracciones de 4 cc cada una, se evaporan individualmente y su pureza se controla mediante cromatografía de capa delgada en placas de gel de sílice en el sistema cloroformo-metanol (99:1).

5.

10a. H-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe

1,11 g del derivado tetrapéptido obtenido bajo 9) se disuelven en 15 cc de ácido acético al 75 % y se deja durante 1 hora a 30°. Después se evapora en alto vacío hasta sequedad y el residuo se frota con éter libre de peróxido. El polvo sólido así obtenido (sal ácido acético del H-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe) se filtra en vacío, se lava con éter y se seca. Rendimiento: 695 mg.

10.

10b. H-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH

740 mg de H-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe se disuelven en 10 cc de metanol y 1,3 cc de agua, bajo calentamiento. Enjuagando con nitrógeno se gotean a temperatura ambiente 3,0 cc de lejía sódica 1,0-N y se agita durante 25 minutos. Después se enfría a 0°, se agregan 3,0 cc de ácido clorhídrico 1,0-N y 20 cc de agua y el precipitado coposo se separa por filtración, se le lava con agua fría y se le seca a temperatura ambiente sobre sosa cáustica en alto vacío hasta obtener constancia en el peso. $Rf_{70} = 0,40$; $Rf_{121A} = 0,45$.

15.

20.

11. H-Thr(tBu)-OMe

12,92 g (40 mmol) de Z-Thr(tBu)-OMe se hidrogenan en 200 cc de ácido acético glacial y 3 g de carbón de Pd (al 10 %) a temperatura ambiente. La recepción de hidrógeno

25.



5. ha terminado después de una hora. La solución se separa del catalizador por filtración y se evapora en vacío a la trompa de agua a 35° . Después de secar el resto vacío a 35° se obtienen 7,3 g de un aceite que, según el cromatograma de capa delgada, es unitario y se sigue empleando directamente.

12. DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-OMe

10. 19,3 g (38,6 mMol) de DPC-Ser(tBu)-OH, sal de ciclohexilamina, se recogen en 500 cc de cloroformo y, a 0° , se agita tres veces con 25 cc de ácido cítrico 1-N y cinco veces con 40 cc de solución de sal común saturada. Después de secar la solución sobre sulfato sódico se evapora y la espuma obtenida se recoge en 250 cc de éster acético. Se agregan 5,36 cc (38,6 mMol) de trietilamina, la solución se enfría a -10° y, bajo agitación, se mezcla con 5,13 cc (38,6 mMol) de isobutilclorocarbonato. Se agita durante 10 minutos a -10° y después se gotea la solución, enfriada a -12° , de 7,3 g (38,6 mMol) de H-Thr(tBu)-OMe en 100 cc de éster acético de manera que la temperatura de reacción no sobrepase nunca los -10° . Terminada la introducción se sigue agitando aún durante una hora a -10° y después se deja reposar durante la noche a temperatura ambiente. La solución se separa por filtración del hidrocioruro de la trietilamina precipitada y, a 0° , se lava tres veces, cada una con 20 cc de ácido cítrico 1-N y cinco veces con solución saturada de sal común, se seca y se evapora. (Producto en bruto (aceite): 22,07 g. Para su limpieza se cromatografía 1 g

15.

20.

25.



en una columna de gel de sílice (2,5 cm, en éter de petróleo-éster acético (1:1) se eluyen, después un lavado previo de 110 cc, 787 mg de producto puro.

En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en tolueno-acetona (7:3) es el $R_f = 0,51$

5.

13. DFC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-NH-NH₂

4,253 g (7,4 mmol) de DFC-Ser(tBu)-Thr(tBu)OMe en 18 cc de metanol se mezclan con 5,55 cc (aprox. 110 mmol) de hidrato de hidrazina y se deja reposar durante 10 horas a temperatura ambiente y 2 horas a 40°. La solución de reacción se recoge en 450 cc de éster acético y se lava cuatro veces con solución de sal común semisaturada. Después de secar la solución sobre sulfato sódico se concentra por evaporación a unos 15 cc y se mezcla con unos 5 cc de éter de petróleo. Durante la noche cristalizan 3,17 g de la hidrazida del p.f. 132-134°.

10.

15.

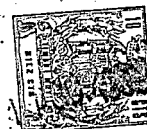
En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en tolueno-acetona (7:3) es el $R_f = 0,40$.

14a. DFC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe

900 mg de DFC-(Ser(tBu)-Thr(tBu)-NHNH₂) en 12 cc de dimetilformamida se mezclan a -20° con 2,0 cc de HCl 2,0-N en éster acético y después con 210 g de t-butilnitrito. Después de 15 minutos a -10° se gotea sobre la solución enfriada a -10° de 680 mg de la sal ácido acético del H-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe en 9 cc de dimetilformamida y entonces se agregan aún 350 mg de N-metilmorfolina. La temperatura de reacción no deberá sobrepasar durante estas adi-

20.

25.



- ciones los -5° . Después se agita durante 1 hora a -5° y durante 18 horas a 25° . Se evapora entonces en vacío y en alto vacío se concentra a un pequeño volumen y el producto en bruto se precipita mediante adición de agua de hielo.
5. El producto se irota a fondo, la solución acuosa se vierte y el hexapéptido insoluble se seca. Para su limpieza se precipita cada vez, dos veces de solución metanólica mediante adición de agua y después de solución de éster acético mediante adición de éter de petróleo. Se obtienen 480 mg
10. de DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe.

14b. DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH

- 857 mg de DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-NH-NH₂ en 8,0 cc de dimetilformamida se mezclan a -10° con 1,87 cc de ácido clorhídrico 2,0-N en éster acético y 0,19 cc de t-butilnitrato. Después de 15 minutos a -10° se gotea, bajo enjuagado con nitrógeno, una solución de 665 mg de H-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH y 0,665 cc de trietilamina en 7 cc de dimetilformamida. Se agita aún durante una hora a -10° y se deja reposar durante 24 horas a 0° . Concentrando la mezcla de reacción a unos 3 cc (alto vacío, 30°) y precipitando con 50 cc de agua se obtiene un producto coposo, que se filtra, se lava con agua y se seca en alto vacío sobre sosa cáustica. Se limpia mediante solución y precipitación en benceno-hexano. Rf = 0,36 en el sistema cloroformo-metanol (7:3).
- 15.
- 20.

25. 15. DPC-Ser(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH

2,3 g del derivado de hexapéptido preparado según 14a) se disuelven en 100 cc de dioxano-agua y se agre-



gen 5 cc de lejía sódica 1-N. Después de 90 minutos a 27° se amortigua la lejía sódica en exceso mediante adición de algo de dióxido de carbono sólido, la solución se concentra en vacío a un volumen de unos 10 cc y después se agregan 80 cc de solución de ácido cítrico acuoso al 2 %, fría como el hielo. El derivado del hexapéptido precipitado se frota a fondo, se filtra en vacío, se lava con varias porciones de agua de hielo y se seca en el secador de vacío.

10. 16. H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH
(sal ácido acético)

870 mg del derivado hexapéptido obtenido bajo 1p) se disuelven en 15 cc de ácido acético al 80 % y la solución se deja durante 6 horas a 30°. Después se evapora en alto vacío a 30° hasta sequedad, el residuo se seca durante 1 hora a 30° y después se mezcla con éter libre de peróxido y el polvo obtenido se frota a fondo. Se filtra en vacío, se lava ulteriormente con mucho éter y se seca.

20. 17. BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-
Met-Leu-Gly-OH

1,0 g de BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NHNH₂ se disuelve en 20 cc de dimetilformamida y la solución enfriada a -10° se mezcla bajo agitación con 1,5 cc de HCl 2,0-N en éster acético y 143 mg de t-butilnitrito. Después de 15 minutos a -10° se agregan otros 10 cc de dimetilformamida enfriada a -10°, 1,0 g de H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH (sal ácido acético) finamente pulverizada y 400 g de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agita bajo



nitrógeno durante 1 hora a -10° y durante 48 a 28° . Después se concentra por evaporación en alto vacío a un volumen de unos 6 cc y el derivado decapéptido se precipita mediante adición de 100 cc de agua de hielo. El precipitado formado se frota, se filtra en vacío y en el secador de vacío se seca sobre sosa cáustica.

El producto muestra en el cromatograma de capa delgada sobre placa de gel de sílice el Rf en cloroformo-metanol (7:3) = 0,60.

10. 18. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH
300 mg de BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH se disuelven en 100 cc de metanol y en el transcurso de 1 hora se gotea a una solución intensamente agitada de 400 mg de yodo en 120 cc de metanol.
15. Terminada la adición se sigue agitando durante 45 minutos y la solución enfriada a 0° se descolorea con solución acuosa 1-N de tiosulfato sódico. Después se concentra en vacío a un volumen de aproximadamente unos 10 cc y el derivado decapéptido se precipita mediante adición de 100 cc de solución acuosa al 1 %, fría como el hielo, de ácido acético. Después de froter, filtrar en vacío y lavar con agua de hielo se seca el producto en el secador sobre sosa cáustica. El producto se somete, para su limpieza, a una distribución de contracorriente en el sistema metanol-tempón-cloroformo-tetraclorocarbono (10:3:5:4) (tempón: 29 cc de ácido acético glacial, 19 g de acetato amónico, completado con agua a 1 litro);
- 20.
- 25.



Las fracciones que contienen el derivado de péptido puro se reúnen, la solución se evapora. Para retirar el acetato amónico se disuelve el producto en cloroformo y la solución se lava tres veces con solución diluida de ácido cítrico y tres veces con agua, y después se evapora hasta sequedad.

5.

Cromatograma de capa delgada sobre placas de gel de sílice
Rf 100 = 0,45; Rf 121A = 0,55, Rf 70 = 0,40, Rf 43C = 0,35.

19. Z-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

3,0 g de hidrocioruro del fenilalaninmetiléster se disuelven junto con 6,17 g de Z-Asp(OtBu)-OMP en 25 cc de N,N-dimetilformamida absoluta e una solución clara y, bajo agitación, se mezcla con 1,93 cc de trietilamina. La suspensión amarillo intenso se agita durante la noche a temperatura ambiente, después se recoge en mucho éster acético

15.

y se lava tres veces con solución acuosa diluida de ácido cítrico, cinco veces con solución acuosa diluida de sosa y finalmente con solución acuosa saturada de sal común hasta que el líquido de lavado se mantenga neutro. Después de secar sobre sulfato sódico se evapora y el aceite, soluble

20.

en éter y en cloroformo, que se ha formado, se limpia mediante cromatografía en columna de gel de sílice (la sustancia se eluye con tolueno y tolueno/éter 4:1); se obtiene un producto incoloro, oleaginoso.

25.

En gel de sílice es el valor Rf en cloroformo, metanol (9:1) 0,75; en cloroformo acetona (1:1) 0,67.

20. H-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃, HCl

770 mg del dipéptido Z-Asp(OtBu)-Phe-OMe se disuelven



5. ven en 200 cc de metanol y bajo adición de 0,60 cc de ácido clorhídrico en dioxano (3,0-N, 1,8 mmol) y 200 mg de catalizador de carbón de paladio (al 10 %) se descarboxiliza con hidrógeno a temperatura ambiente. Terminada la recepción muy rápida de hidrógeno se filtra, se evapora, en éster acético se separa por filtración de algo insoluble y se precipita con éter.

10. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice, en el sistema cloroformo-metanol (9:1), es el $R_f = 0,60$; $R_f 430 = 0,63$.

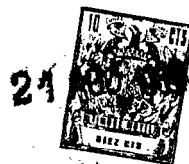
21. Z-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

15. 550 mg de H-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃, HCl se disuelven junto con 574 mg de Z-Gln-ONP en 2,5 cc de N,N-dimetilformamida absoluta y con 0,20 cc de trietilamina se agita durante 15 horas a una temperatura del baño de 30-35°. A continuación se agita en nuevo éster acético como descrito bajo 19, se seca y se evapora.

22. H-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃, HCl

20. 4,4 g de Z-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se descarboxilizan en 300 cc de metanol, después de agregar 2,4 cc de ácido clorhídrico en dioxano (3,0-N, 7,2 mmol) y 900 mg de catalizador al 10 % de carbón-paladio, con hidrógeno a temperatura ambiente. Terminada la recepción de hidrógeno se filtra y se evapora en vacío hasta sequedad. El residuo sólido, amarillento, se frota dos veces con éter y sin ulterior limpieza se emplea para siguiente etapa.

25.



23. Z-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

3,68 g de Z-Thr(tBu)-OH, sel dicitclohexilamónico, se agitan en éster acético tres veces con solución acuosa diluida de ácido cítrico y tres veces con solución acuosa saturada de sal común, se seca sobre sulfato sódico y se evapora. El aceite claro como el agua resultante se agita con 3,34 g de H-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃, HCl en 40 cc de cloruro metilénico, se agregan 0,9 cc de trietilamina y la solución de 1,54 g de dicitclohexilcarbodiimida en 10 cc de cloruro metilénico se gotea. Se lava ulteriormente con 10 cc de cloruro metilénico y la suspensión se agita a temperatura ambiente durante 14 horas. Después se coloca durante 2 horas en la nevera, el precipitado sólido se filtra, se le lava con poco cloruro metilénico y el filtrado se agita con mucho éster acético como descrito en 19. El residuo de evaporación amorfo se frota con éter-hexano (1:1) y se seca.

24. H-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

4,3 g de Z-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se hidrogenan en 300 cc de metanol con 1 g de catalizador de paladio-carbón al 10 % en la forma usual, terminada la recepción de hidrógeno se filtra y se evapora. El residuo de evaporación, una espuma sólida, incolora, se emplea sin ulterior limpieza en la etapa siguiente.

25. Z-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

Se liberan de 3,5 g de Z-Tyr(tBu)-OH, sel dicitclohexilamónico en éster acético, como descrito bajo 23 con 5-



- cido cítrico, el ácido y el aceite clavo, obtenidos, se agita con 3,29 g de H-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ en 80 cc de acetonitrilo. A esto se agregan 1,31 g de dicitclohexilcarbodiimida en forma sólida y se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. Se separa ahora por filtración de la dicitclohexilúrea precipitada, ésta se lava con algo de acetonitrilo y el filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en mucho cloroformo y se agita, esto con tres veces solución acuosa diluida de ácido cítrico, tres veces con solución acuosa diluida de sosa y cuatro veces con solución saturada de sal común. Después de secar sobre sulfato sódico se evapora y el residuo se disuelve en metanol-éster acético (1:8) y se precipita en frío con éter de petróleo. Se repite la precipitación. El pentapéptido protegido resultante es un polvo de grano fino.
- 5.
- 10.
- 15.

26. H-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

- 4,0 g de Z-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se descarboxilizan en 100 cc de N,N-dimetilformamida absoluta, previamente hidrogenada, bajo adición de 1,4 g de carbón-paladio al 10 %, a temperatura ambiente con hidrógeno. Terminada la recepción de hidrógeno se diluye con 400 cc de metanol, se filtra y se evapora en vacío. El residuo sólido, incoloro se emplea sin ulterior limpieza para la etapa siguiente.
- 20.

25. 27. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

De 2,85 g de Z-Thr(tBu)-OH, sal dicitclohexilamónica, se libera el ácido en éster acético como descrito bajo



- 23, y el aceite del Z-Thr(tBu)-OH obtenido se agita, a temperatura ambiente, con 3,33 g de H-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ en 80 cc de acetnitrilo. A esto se agregan en forma sólida 1,20 g de dicitohexilcarbodiimido y se agita durante 23 horas a temperatura ambiente. Después de separar por filtración de la dicitohexilúrea precipitada, que se lava con tres porciones de 7 cc cada una de acetnitrilo, se evapora en vacío y el residuo se precipita tres veces, en éster acético/solución de alcohol, con éter de petróleo.
- 5.
- 10.

28. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln(OtBu)-Phe-NHNH₂

- 1,3 g de Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se disuelven en 30 cc de metanol y a 0° se mezcla con 0,6 cc de hidrato de hidrazina. Se deja durante tres días en la nevera con lo que se precipita un precipitado gelatinoso. Este se solidifica adicionando éter, se filtra y el residuo se recristaliza en metanol/éter.
- 15.

29. Z-Lys(BOC)-Phe-OMe

- 25,0 g de Z-Lys(BOC)-ONP y 10,7 g de H-Phe-OMe, HCl en 70 cc de dimetilformamida se mezclan bajo agitación, a temperatura ambiente, con 6,9 cc de trietilamina y se agita aún durante 18 horas. Después de diluir con éster acético se lava con solución de carbonato potásico hasta estar libre de nitrofenol, se agita con ácido cítrico 0,1-N y agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora en vacío hasta sequedad. De éster acético-hexano cristaliza el dipéptido protegido del p.f. 78-80°.
- 20.
- 25.

Rf = 0,45 en el cromatograma de capa delgada en gel de sí-



lice en el sistema cloroformo-acetona (3:2).

30. Z-Lys(BOC)-Phe-NH-NH₂

27 g del metiléter del dipéptido de arriba se disuelven en 135 cc de metanol caliente, a temperatura ambiente se mezcla con 25 cc de hidrato de hidrazina y se deja reposar durante 16 horas. El cristalizado se mezcla con 135 cc de agua, se filtra en vacío y se lava bien con agua. P.f. 173-174° después de recristalizar en metanol-agua. Rf = 0,3 en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice en el sistema cloroformo-metanol (95:5).

31. Z-Lys(BOC)-Phe-His-OMe

5,4 g de Z-Lys(BOC)-Phe-NH-NH₂ en 40 cc de dimetilformamida se mezclan a -16° con 6,8 cc de HCl 3,66-N en dicloroetano y después con 1,5 cc de t-butilnitrito. Después de 10 minutos a -10° hasta -15° se agregan 3,5 cc de trietilamina. Se agregan 3,64 g de H-His-OMe, 2 HCl sólido, a continuación se gotean 4,2 cc de trietilamina. Se deja calentar en el plazo de 1 hora a 0° manteniéndose mediante adición de un total de 0,8 cc de trietilamina un pH de aproximadamente 7. Después de agitar durante la noche a 0° se vierte en 250 cc de agua y el producto untuoso se obtiene en forma pulverulenta frotando con agua. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en cloroformo-metanol (9:1) es el Rf = 0,4. P.f. 136-137 (en éster acético).

32. H-Lys(BOC)-Phe-His-OMe

6,8 g de Z-Lys(BOC)-Phe-His-OMe en 140 cc de metanol se hidrogenan en presencia de 1 g de carbón Pd al 10%.



Terminada la hidrogenación se separa el catalizador por filtración, el filtrado se evapora hasta sequedad y el residuo se sigue elaborando inmediatamente.

33. Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-OMe

5. El metiléster del tripéptido obtenido bajo 32 (5,4 g) y 4,5 g de Z-Asn-ONP se agitan en 20 cc de dimetilformamida durante 20 horas a temperatura ambiente. Después de agregar éter-hexano se precipita el derivado del péptido, se filtra y se libera con éter del nitrofenol. Se limpia
10. disolviendo y precipitando de dimetilformamida-éter. El producto es unitario en el cromatograma de capa delgada.

34. Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-NH-NH₂

15. 3,97 g de Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-OMe se disuelven en 20 cc de metanol hirviendo. A la solución aún caliente a unos 30° se agregan 2,5 cc de hidrato de hidrazina y se deja reposar durante 20 horas a temperatura ambiente. Mediante adición de agua se precipita el hidrazida del péptido, se separa por filtración y con agua se lava hasta estar libre de hidrazina. El producto se disuelve y precipita en dimetilformamida-agua.
20.

35. Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-OH

25. 4 g de Z-Phe-Pro-OH se disuelven en metanol-agua (4:1) y se hidrogena en presencia de carbón de paladio (10% de Pd). Terminada la recepción de hidrógeno se separa por filtración del catalizador, el filtrado se evapora hasta sequedad y el residuo (H-Phe-Pro-OH) se seca. Este se mezcla con 1,1 g de N-metilmorfolina y tanta agua hasta que el



producto justamente se disuelva. La solución se diluye con dimetilformamida hasta que quede una solución clara, después se enfría a -5° . A esto se agrega una solución del anhídrido mixto del Z-Thr(tBu)-OH que se prepara de la manera siguiente:

5. 3,6 g de Z-Thr(tBu)-OH se disuelven en 40 cc de tetrahidrofureno absoluto, se agregan 1,8 cc de trietilamina absoluta y la solución enfriada a -10° se mezcla con 1,7 g de clorocarbonato de isobutilo. Después de 5 minutos a

10. -10° se vierte, sin tener en consideración el hidrocioruro trietilamínico precipitado, toda la mezcla de reacción a la solución de dipéptido de arriba. La mezcla se deja durante 1 hora a -5° y durante 18 horas a 5° . Después se separa por filtración de lo insoluble, el eluado se libera en vacío del tetrahidrofureno y en alto vacío de la dimetilformamida y

15. el residuo se mezcla con solución de bicarbonato sódico. Las partes insolubles se retiran lavando con éter, la fase acuosa se recubre con éster acético y se acidifica. El derivado tripéptido se extrae con éster acético y la solución ester acética se lava neutro con agua. Después de secar sobre sulfato sódico y evaporar se obtiene el Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-OH como producto resinoso incoloro. Para su limpieza se disuelve y precipita de benceno-éter de petróleo varias veces.

20. 36. Z-Ile-Gly-OMe

2,23 g de sal dicitclohexilamónica de Z-Ile-OH se suspenden en éster acético y se acidifica con ácido cítrico 0,2-n. La solución éster acética obtenida se lava neu-

25. trico.



- tro, se seca y se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en 15 cc de acetonitrilo, a la solución se agregan 750 mg de H-Gly-OMe, HCl y a 0°, bajo agitación, 0,84 cc de trietilamina. Después de 10 minutos se agregan 1,24 g de dicitclohexilcarbodiimida y se agita durante la noche a 0°.
5. El precipitado se separa por filtración y el filtrado se evapora hasta sequedad, el residuo se recoge en 30 cc de éster acético y se filtra. La solución éster acética se lava con ácido cítrico 0,2-m y solución saturada de bicarbonato sódico, se seca y en vacío se concentra a unos 10 cc. Después de agregar 25 cc de hexano cristaliza el dipéptido protegido, p.f. 120-122°. Rf = 0,53 en el sistema cloroformo-metanol (95:5) en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice.

15. 37. H-Ile-Gly-OMe

- 3,36 g de Z-Ile-Gly-OMe se disuelven en 100 cc de metanol y 10 cc de ácido clorhídrico 1-N y se hidrogena en presencia de 0,5 g de carbón de paladio (al 10 %). Después de separar el catalizador por filtración se evapora totalmente el disolvente. La espuma obtenida es unitaria en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice; Rf = 0,26 en cloroformo-metanol (95:5).
- 20.

38. Z-Ala-Ile-Gly-OMe

- 2,39 g del hidrocioruro del éster del dipéptido de arriba y 3,78 g de Z-Ala-ONP en 40 cc de dimetilformamida se mezclan bajo agitación con 1,4 cc de trietilamina y la suspensión obtenida se agita, durante la noche, a temperatura ambiente. Después de diluir con éster acético se lava
- 25.



- con solución diluida de carbonato potásico hasta estar libre de nitrofenol, a continuación se lava aún con ácido cítrico 0,1-N y agua. Una parte del derivado del tripéptido se mantiene durante la agitación sin disolver, se filtra.
5. La solución éster acética se evapora totalmente después de secar. El residuo se compone asimismo de producto puro. P.f. 190-191⁰, Rf = 0,5 en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice en el sistema cloroformo-metanol (95:5).

39. H-Ala-Ile-Gly-OMe

10. 2,0 g de Z-Ala-Ile-Gly-OMe se disuelven en 40 cc de metanol bajo ligero calentamiento, después se hidrogena en presencia de 300 mg de carbón de paladio (al 10%). Terminada la hidrogenación se separa del catalizador por filtración y el filtrado se evapora totalmente hasta sequedad.
15. El residuo unitario en el cromatograma de capa delgada se sigue elaborando inmediatamente.

40. Z-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe

20. 1,36 g del éster del tripéptido de arriba y 2,6 g de Z-Thr(tBu)-ONP se agitan en 3 cc de dimetilformamida durante 20 horas a temperatura ambiente. El derivado del tetrapéptido se precipita con éter, se separa por filtración y con éter se lava hasta estar libre de nitrofenol. El producto se limpia disolviendo y precipitando en dimetilformamida-éter.

25. 41. H-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe

- 5,66 g del compuesto carbobenzoilo de arriba se hidrogenan en 50 cc de dimetilformamida y en presencia de 1 g



de carbón de paladio (al 10 %). Después de separar el cohe-
lizador por filtración a través de una capa de 2 g de nori-
ta se evapora la dimetilformamida totalmente en alto vacío
a 40°. El residuo amorfo se sigue elaborando en bruto.

5. 42. H-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

4,3 g del metiléster del tetrapéptido se disuel-
ven en 43 cc de metanol bajo ligero calentamiento. Después
de enfriar a 20° se agregan 12 cc de lejía sódica l-N. Des-
pués de 5, 10 y 15 minutos se agregan, cada vez, 5 cc de
10. agua. Después de 1 hora a temperatura ambiente se agregan
12 cc de ácido clorhídrico l-N, se libera en vacío del me-
tanol y se extrae con n-butanol. La solución butanólica se
lava con agua hasta estar libre de cloruro, después se
evapora sin secar, en vacío hasta sequedad. El residuo se
15. emplea sin ulterior limpieza para la siguiente etapa.

43. Z-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

El derivado del tetrapéptido arriba obtenido (4,2
g) se agita junto con 4,8 g de Z-Gln-ONP y 1,35 cc de tri-
etilamina en 30 cc de dimetilformamida durante 24 horas a
20. temperatura ambiente. Después de agregar éter se precipita
el producto, después se filtra en vacío y con éter se lava
hasta estar libre de nitrofenol. Después de disolver en n-bu-
tanol saturado con agua se agita, a 0°, con ácido clorhídrico
l-N, después se lava con agua hasta estar libre de cloruro
25. y sin secar se evapora en vacío a 40°. Volviendo a disol-
ver y precipitar en dimetilformamida-éter se obtiene el pro-
ducto puro. Después de secar en alto vacío a 40° sobre pen-



tóxido de fósforo se obtiene en la titración potenciométrica, con NaOH 0,1-N en metanol al 80 %, un peso equivalente de 693, calculado 680.

44. H-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH, HCl

5. 3,40 g de Z-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH se disuelven en 70 cc de dimetilformamida caliente. Después de enfriarse a temperatura ambiente se agregan 5 cc de ácido clorhídrico 1-N y 500 mg de carbón de paladio (al 10 %) y se hidrogena. Terminada la hidrogenación se filtra en vacío el catalizador a través de 1 g de norita y el filtrado se concentra por evaporación en alto vacío a 40° a unos 10 cc. Este solución se gotea en 100 cc de éter, el material precipitado se separa por filtración y se lava con éter. El producto secado en alto vacío a temperatura ambiente da, en la
10. titración potenciométrica con lejía sódica 0,1-N en metanol al 80 %, un contenido de un 91 %.
- 15.

45. Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

20. 2,8 g de Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-OH y 0,77 cc de trietilamina absoluta se disuelven en 30 cc de tetrahidrofurano seco y la solución enfriada a -10° se mezcla, gota a gota, con 700 mg de isobutilclorocarbonato, cuidándose que la temperatura no sobrepase los -5°. Después se deja durante 10 minutos a -10° y seguidamente se vierte una solución enfriada a -20° de 2,5 g de H-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH,
25. HCl en 65 cc de dimetilformamida-agua (9:1). Se agregan entonces, gota a gota, 1,2 cc de trietilamina y se deja durante 1 hora a -10° y durante 18 horas a 0°. Se concentra en-



4. entonces por evaporación en vacío y después en alto vacío a 40° de temperatura del baño a un volumen de unos 15 cc y después se precipita mediante adición de 100 cc de ácido acético al 2 % frío como el hielo. Se filtra en vacío, se lava con agua de hielo, se seca y para su limpieza se disuelve y precipita dos veces en metanol-agua, rendimiento: 3,9 g de derivado de octapéptido.

46. H-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

10. 3,6 g del Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH obtenido bajo 45) se disuelven en 100 cc de ácido acético al 80 % y la solución se hidrogena en presencia de 0,5 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la recepción de hidrógeno se separa el catalizador por filtración en vacío y la solución se evapora hasta sequedad. La 15. sal ácido acética del derivado del octapéptido, obtenida como película incolora, se seca en alto vacío.

47. Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

20. 1,60 g de Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-hidrazida se mezclan con 25 cc de dimetilformamida, después se enfría a -20° y después se agregan 4 cc de ácido clorhídrico acuoso 2,5-N. Se agita a -20° hasta que se haya disuelto totalmente el hidrazida. Se gotean entonces 2,0 cc de solución 1,0-N de nitrito sódico, la mezcla de reacción se calienta a 25. -10° y se deja durante 20 minutos a -10°. Se vierte entonces en una solución enfriada a -10° de 1,50 g de H-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH (sal ácido acética) en



25 cc de dimetilformamida al 80 % y 1,11 g de N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se deja durante 16 horas a 0°. Después se evapora en alto vacío a un volumen de unos 8 cc y se precipita mediante adición de ácido acético al 1 %, frío como el hielo. Después se filtrar en vacío y secar en el secador de vacío se disuelve y precipita el producto en bruto, para su limpieza, dos veces el dimetilformamida-éster acético. El rendimiento en dodecapéptido protegido asciende a 2,1 g.

10. 48. H-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

1,85 g del dodecapéptido protegido de arriba se disuelven en 50 cc de ácido acético al 90 % y se hidrogena en la forma usual en presencia de 0,4 g de carbón de paladio (10 % de Pd). La sal ácido acético del H-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH que queda, después de filtrar en vacío el catalizador, evaporar la solución y secar en alto vacío, se sigue elaborando sin ulterior limpieza.

20. 49. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

2,30 g de Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-NH-NH₂ se disuelven en 35 cc de dimetilformamida y se gotea a la solución enfriada a -20° de 3,5 cc de ácido clorhídrico 3-N acuoso. Se agregan entonces 2,7 cc de solución 0,9-N de nitrito sódico y la mezcla de reacción se deja reposar durante 20 minutos a -10°. Después se gotea la

25.



- solución enfriada a -10° de 1,72 g de H-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH (sal ácido acético) en 50 cc de dimetilformamida el 90 % y 1,0 g de N-metilmorfolina. La mezcla se deja reposar durante 18 horas a 0° , después se concentra por evaporación en alto vacío hasta una consistencia oleaginosa y el producto se precipita mediante adición de 100 cc de solución de ácido cítrico al 2 % fría como el hielo. El precipitado se frota a fondo, se separa por centrifugación, se lava ulteriormente 4 veces con pequeñas porciones de agua de hielo y en el secador de vacío se seca sobre sosa cáustica. Para la limpieza se disuelve y precipita varias veces en dimetilformamida-éster acético.
- 5.
- 10.

50. Z-Ala-Pro-NH₂

15. 2,28 g de H-Pro-NH₂ y 7,57 g de Z-Ala-ONP se disuelven en 20 cc de dimetilformamida y la solución amarilla se deja reposar durante 18 horas a temperatura ambiente. Después se evapora en alto vacío hasta sequedad, el residuo se mezcla con éster acético y el polvo formado se frota a fondo. Después de filtrar en vacío y secar se obtienen 5,5 g de Z-Ala-Pro-NH₂ del p.f. $164-165^{\circ}$.
- 20.

51. Z-Gly-Ala-Pro-NH₂

25. 5,1 g del derivado dipéptido de arriba se disuelven, bajo calentamiento, en 200 cc de una mezcla de t-butanol-agua (9:1) previamente hidrogenada. La solución enfriada a temperatura ambiente se hidrogena en presencia de 1 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la hidrogena-



- ción se evapora la solución inmediatamente a una temperatura del baño de 30° y 0,01 Torr hasta sequedad, el residuo de H-Ala-Pro-NH₂ se disuelve en 300 cc de dimetilformamida enfriada a -20° y después se agrega la solución, preparada
5. como sigue, del anhídrido mixto de Z-Gly-OH:
- 3,7 g de Z-Gly-OH y 2,65 cc de trietilamina absoluta se disuelven en 25 cc de tetrahidrofurano absoluto y se gotea a la solución enfriada a -10° de 1,85 g de clorocarbonato de etilo, bajo agitación y refrigeración, de manera que la temperatura no sobrepase los -5° . Después se enfría a -10° , se deja reposar durante 5 minutos y después se vierte la mezcla, sin tener en consideración el hidrocioruro de trietilamina precipitado, a la solución de H-Ala-Pro-NH₂ de arriba. Después de 1 hora a -10° y 18 horas a 0° se separa la solución por filtración y el filtrado se evapora en vacío y después en alto vacío hasta sequedad. Después se mezcla con 1 litro de cloroformo, se separa por filtración en vacío del hidrocioruro trietilamínico, la solución clorofórmica se lava dos veces, cada una con 20 cc de solución semisaturada de cloruro sódico, se seca con sulfato sódico y se evapora. El derivado del tripéptido obtenido muestra en la cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice el Rf = 0,58 (en metanol).
- 10.
- 15.
- 20.
25. 52. H-Gly-Ala-Pro-NH₂
- 3,8 g del derivado tripéptido en bruto obtenido bajo 51 se hidrogenan como descrito bajo 51. El residuo que queda después de separar el catalizador por evaporación



en vacío y evaporar el disolvente, muestra en la cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice en metanol el $R_f = 0,15$, rendimiento 2,2 g.

53. Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

5. El amida del tripéptido en bruto obtenido bajo 52 se disuelve en 30 cc de dimetilformamida. A la solución se agregan 4,1 g de Z-Val-p-nitrofeniléster. Después de reposar durante 18 horas a temperatura ambiente se evapora la solución amarilla hasta sequedad, el residuo se mezcla con éster acético, se frota, se filtra en vacío, el polvo gelatinoso se disuelve en 2 litros de cloroformo, la solución se lava 2 veces, cada una con 20 cc de ácido cítrico al 5 % y dos veces con solución saturada de cloruro sódico.
10. Después se seca la solución cloroformica con sulfato sódico y se evapora. El residuo de la evaporación se mezcla, bajo calentamiento, con 100 cc de éster acético y después de reposar a 0° se separa por filtración en vacío el derivado tetrapéptido precipitado como polvo sólido; p.f. 205 - 210°, valor R_f en placas de gel de sílice = 0,80 en cloroformo-metanol (1:1).
- 15.
- 20.

54. H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

25. 1,1 g de Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se disuelven en 50 cc de dimetilformamida y la solución se hidrogena en presencia de 0,3 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la recepción de hidrógeno se separa del catalizador por filtración en vacío, la solución se evapora y el residuo se seca en alto vacío a una temperatura del baño de 35°. Se obtie



ne así el tetrapéptido H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ como sustancia incolora, valor Rf = 0,20 (placas de gel de sílice, sistema cloroformo-metanol = 1:1).

5. 55. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys-
(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-
Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

800 mg de Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH, 510 mg de H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ y 120 mg de N-hidroxisuccinimida se disuelven en 9 cc de dimetilformamida bajo agitación a 45° y después se agregan 120 mg de dicitclohexilcarbodiimida. La mezcla de reacción se agita a 45° en total durante 12 horas agregándose después de 3 y 7 horas cada vez aún 20 mg de dicitclohexilcarbodiimida y 20 mg de N-hidroxisuccinimida. Después se vierte en 200 cc de éter y el precipitado fino se separa por filtración en vacío. Para su limpieza se somete el producto a una distribución de contracorriente en el sistema metanol-tampón-cloroformo-tetraclorocarbono (10:3:5:6, tampón como bajo 18).

20. 56. H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-
Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-
Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

25. 227 mg del docosapéptido-amida protegido obtenido bajo 55 se disuelven en 10 cc de ácido acético al 90 % y la solución se hidrogena en presencia de 100 mg de carbón de paladio (10 % de Pd) bajo intensa agitación. Terminada la recepción de hidrógeno se separa del catalizador por filtra-

21 AGO 1966



ción y el filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en n-butanol saturado con agua y se agita tres veces con pequeñas porciones de solución al 5 % de carbonato sódico y dos veces con poca agua. Después se evapora

5. la solución de butanol, sin haberlo secado previamente, en alto vacío a una temperatura del baño de 35° y el residuo se seca en alto vacío. Se obtienen así 185 mg del dodecapéptido descárbobenzoxilado como resina incolora.

10. 57. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

15. 181 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH, 288 mg de H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Glu-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ y 23 mg de N-hidroxisuccinimida se disuelven en 2 cc de dimetilformamida absoluta, bajo calentamiento, y después de enfriar a temperatura ambiente se mezcla con 31 mg de dicitclohexilcarbodiimida. El vesito se enjuaga entonces con nitrógeno, se

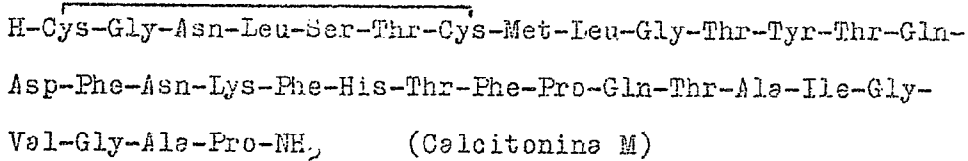
20. cierra y se deja reposar durante 15 horas a 45°. La dicitclohexilurea cristalina formada se separa por filtración, se lava dos veces, cada una con 0,5 cc de dimetilformamida, el filtrado se concentra por evaporación en alto vacío a la mitad de su volumen y el producto en bruto se precipita mediante adición de 20 cc de benceno y 120 cc de éter de petróleo. Para su limpieza se vuelve a disolver y precipitar una vez de metanol-benceno-hexano, se separa por filtración y a 45° se seca hasta obtener un peso constante. Se obtiene

25.



- así el dotriacontapéptido-amida protegida como polvo amorfo que en la cromatografía de capa delgada muestra una mancha principal y distintos productos secundarios. Este se puede emplear en este estado para la disociación de los
5. grupos protectores.

Ejemplo 2



10. 23 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se recubren a 0° con 0,6 cc de ácido clorhídrico concentrado, el recipiente se enjuaga con nitrógeno, se cierra y a 0° se agita durante 10 minutos. Se enfría entonces a unos -60°, se evacua en alto vacío y la solución se concentra aumentando lentamente la temperatura hasta 0° hasta obtener un jerebe. Después de agregar 0,4 cc de agua se liofiliza, el residuo se disuelve en 0,2 cc de ácido acético 0,1-N y para su transformación en el acetato se filtra a través de una columna ($\emptyset = 6$ mm; l = 100 mm) de intercambiadores de iones débilmente básicos (por ejemplo, Merck nº II) que se equilibró con ácido acético 0,1-N. El eluado se concentra hasta un volumen de 0,5 mm, se liofiliza, se seca ulteriormente a 40° en alto vacío y finalmente se equilibra con la humedad de la atmós-
- 15.
- 20.



fera dejéndole reposar en el recipiente abierto. Se obtiene así el acetato de la calcitonina M como polvo blanco, hidrosoluble.

5. El dotriacontapéptido-amida protegido, empleado como producto de partida, se puede preparar de la manera siguiente:

1. H-Gly-Asn-Leu-OMe

10. 2,0 g de Z-Gly-Asn-Leu-OMe (del p.f. 158-159^o después de recristalizar en metanol-agua) se disuelven bajo calentamiento en 20 cc de metanol y se hidrogena con 200 mg de carbón de paladio (10 % de Pd) hasta terminar la recepción de hidrógeno. El catalizador se separa por filtración y el filtrado se concentra a una temperatura del baño de 15. 40^o por evaporación hasta sequedad, con lo que se obtiene el tripéptido-metiléter directamente en forma cristalina pura (1,34 g; p.f. 138-139^o). En caso necesario se puede recristalizar en metanol-éster acético-éter de petróleo. Rf₅₂ = 0,22 (sobre gel de sílice).

2. BOC-Cys-(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe

20. 5,7 g de H-Gly-Asn-Leu-OMe, 9,2 g de BOC-Cys(TRI)-OH y 4,16 g de N-hidroxisuccinimida se disuelven en 200 cc de dimetilformamida, se enfría a 0^o y bajo agitación se mezcla con 5,57 g de dicitclohexilcarbodiimida en forma sólida. Se agita aún durante una hora a 0^o; se deja entonces reposar 25. durante la noche a unos 20^o, se concentra por evaporación en alto vacío a un volumen de unos 100 cc y separa por filtración de la dicitclohexilúrea precipitada. El precipitado se sigue entonces concentrando por evaporación en alto



vacío hasta formar una masa pegajosa, se disuelve en 200 cc de n-butanol y consecutivamente se lava con agua, solución al 5 % de ácido tártrico, l-N bicarbonato sódico y nuevamente con agua. La solución se concentra ahora a un volumen de unos 50 cc y de esto se precipita el derivado tetrapéptido mediante adición de 300 cc de éter de petróleo. Se limpia disolviendo y precipitando en dimetilformamida-agua y en metanol-éster acético-éter de petróleo y se obtiene así el derivado tetrapéptido como polvo amorfo del punto de fusión 145 - 148°. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice muestra éste los siguientes valores Rf:

Rf 115 = 0,68; Rf (acetona) = 0,59; Rf (cloroformo-metanol 8:2) = 0,60.

3. BOC-Cys-(TRI)-Gly-Asn-Leu-NHNH₂

15. 2,7 g de BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe se disuelven en 22 cc de metanol, se enfría a 0° y se mezcla con 2,2 cc de hidrato de hidrazina. Después de unos 30 minutos a 0° se deja reposar la solución durante la noche a unos 20°, se vuelve a enfriar a 0° y se mezcla entonces con 102 cc de ácido acético al 3 % frío como el hielo. El precipitado se homogeniza bien, se separa por filtración y en el filtro de vacío se lava con ácido acético al 3 %, frío como el hielo, hasta que la reacción de Folin sea negativa en el líquido de lavado y a continuación se seca. Se obtienen 2,2 g de hidrazida del tetrapéptido, cromatográficamente puro, del punto de descomposición alrededor de los 195°. Este muestra en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice los siguientes valores Rf: Rf (cloroformo-metanol 8:2) = 0,30;



Rf (acetona-metanol 9:1) = 0,53.

4. BOC-Met-Leu-Gly-OMe

5. 6,72 g de L-Leu-Gly-OMe se hidrogenan en 50 cc de metanol con 500 mg de carbón de paladio (10 % de Pd) hasta terminar la recepción de hidrógeno. La solución se separa del catalizador por filtración y en vacío se concentra a unos 10 cc, se diluye con 30 cc de dimetilformamida y en alto vacío se vuelve a concentrar a unos 20 cc. Enfriando con hielo se agregan 7,7 g de BOC-Met-OCP, la solución clara se deja reposar durante 6 horas a 20° y el disolvente se evapora en alto vacío. El residuo oleinoso se disuelve en éster acético y consecutivamente se lava a 0° con solución de potasa al 5 %, ácido clorhídrico 0,2-N y finalmente con agua; la fase orgánica se seca sobre sulfato sódico y se concentra por evaporación hasta sequedad. El residuo oleinoso se recristaliza en benceno-éter de petróleo; p.f. 126-127°; en gel de sílice es el Rf 43 C = 0,66; Rf (tolueno-acetona 1:1) = 0,58.

5. H-Met-Leu-Gly-OMe, hidrocioruro

20. 3,24 g de BOC-Met-Leu-Gly-OMe se disuelven en 13 cc de ácido clorhídrico 3,8-N en éster acético y se deja reposar durante 30 minutos a 20°. Mediante adición de 100 cc de éter de petróleo se precipita el hidrocioruro del tripéptido-éster como masa pegajosa y la solución sobrenadante se decanta. Frontando con 100 cc de éter libre de peróxido a 0° se obtiene un producto finamente pulverulento que se separa por filtración y sobre hidróxido potásico se seca en el secador hasta obtener un peso constante. El



compuesto es cromatográficamente puro, pero amorfo y muy higroscópico. En gel de sílice muestra los siguientes valores Rf: Rf 43 C = 0,48; Rf (tolueno-acetona 1:1) = 0,35.

6. TRI-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe

5. 3,22 g de TRI-Cys(TRI)-OH, 1,97 g de H-Met-Leu-Gly-OMe-hidrocloruro y 0,74 cc de trietilamina se disuelven en 32 cc de acetonitrilo y se agregan 1,54 g de dicitclohexilcarbodiimida en forma sólida. La solución, al principio clara, de la que se separa dicitclohexilúrea, se deja reposar durante 16 horas a 20°. Después se enfría a 0°, se agregan 100 cc de agua, se homogeniza y el precipitado blanco se separa por filtración. Se lava con agua, se seca y después se frota durante 5 minutos a 40° con 50 cc de éster acético. La dicitclohexilúrea insoluble se separa por filtración a temperatura ambiente y se lava con 20 cc de éster acético. Del filtrado se precipita el derivado tetrapéptido mediante adición de 300 cc de éter de petróleo como precipitado gelatinoso, se separa por filtración y se seca. Al disolver y precipitar este producto en bruto de metanol-éster acético-éter de petróleo se obtiene un producto cromatográficamente unitario del p.f. 215° aproximadamente.
10. Sobre gel de sílice muestra éste los siguientes valores Rf: en el sistema CHCl₃-metanol (97:3) Rf = 0,57; en n-butilacetato Rf = 0,51.
- 15.
- 20.

25. 7. H-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe, acetato

A una solución de 1,852 g de TRI-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe en 16 cc de ácido acético glacial se gotean 4 cc de agua de manera que el precipitado formado se vuelva



5. a disolver de nuevo. La solución clara se agita durante una hora a temperatura ambiente y después se mezcla a 0° con 12 cc de agua, se filtra y el precipitado se lava con ácido acético al 50 % frío. El filtrado se evapora en alto vacío a 30° hasta obtener un aceite, éste se frota con agua y se liofiliza. El polvo blanco obtenido se seca durante 15 horas sobre hidróxido sódico en alto vacío. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice demuestra ser el producto unitario. En tolueno-acetona (7:3) Rf = 0,28, en cloroformo-metanol (95:5) Rf = 0,48.
- 10.

8. DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe

15. 2,284 g de DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-NH-NH₂ (véase el ejemplo 1, sub 13) en 15 cc de dimetilformamida se mezclan a -20° con 6,5 cc de ácido clorhídrico 1,53-N en éster acético y 0,51 cc de t-butilnitrito y se agita durante 15 minutos a -10°. Después de agregar 1,4 cc de trietilamina se gotea la solución enfriada a -10° de 1,406 g de H-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe-acetato en 10 cc de dimetilformamida. El pH de la solución de reacción asciende entonces a ~5.
20. Mediante adición de 2 gotas de trietilamina en dimetilformamida (2,8 cc de trietilamina completada con dimetilformamida a 10 cc) se ajusta el pH 7 - 8. Después de 5, 10 y 20 minutos se aumenta cada vez con 2 gotas de solución de trietilamina el pH de nuevo a 7 - 8. Después se mantiene este valor constante. La solución de reacción se mantiene
25. durante una hora a -10° y durante 15 horas a 0°. Después se separa por filtración del hidrocloreuro trietilamínico pre-



precipitado y el filtrado se evapora a 30° en alto vacío hasta obtener un aceite. Frutando con agua se obtiene un polvo que se lava con agua y se liofiliza después de froter con agua. Después de froter dos veces con 10 cc de benceno-éter de petróleo (1:2) se obtiene el derivado hexapéptido en forma pura. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en tolueno-acetona (7:3) es el Rf = 0,42.

8a. DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-OH

5,7 g de DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-NH-NH₂ en 50 cc de dimetilformamida se mezclan a -15° con 16,35 cc de ácido clorhídrico 1,53-N en éster acético y 1,4 cc de t-butilnitrito y se deja reposar durante 15 minutos a -10°. Después de agregar 3,5 cc de trietilamina se gotea una solución enfriada a -10° de 3,63 g de H-Cys(TRI)-OH y 1,4 cc de trietilamina en 40 cc de dimetilformamida y 16 cc de agua, se agita durante una hora a -10° y se mantiene durante 15 horas a 0°. La solución clara se evapora a 40° en alto vacío, el residuo se recoge en éster acético y agua y la fase orgánica se lava con solución de sal común saturada en un 50 %. El aceite obtenido después de evaporar el disolvente se disuelve en poco éster acético y se gotea en 300 cc de éter de petróleo (agitado a 0°). El producto se precipita como un polvo ligeramente amarillento. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en el sistema cloroformo-metanol (7:3) es el Rf = 0,62.

25. 8b. H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-OH

909 mg de DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cis(TRI)-OH se



- disuelven en 10 cc de cloruro metilénico, se mezcla con 12 cc de ácido monocloroacético en agua (de 75 g de ácido cloroacético y 25 cc de agua) y se agita a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución se enfría entonces a 0°, se mezcla con 50 cc de agua y con amoníaco concentrado se ajusta un pH de 6,5. Se precipita así el producto en forma de aceite. Este se lava aún dos veces con agua, después se recoge en t-butanol y se liofiliza. Frotando el liofilizado con éter de petróleo se obtiene un producto unitario. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en cloroformo-metanol (1:1) es el Rf = 0,40; en metanol Rf = 0,50.
- 5.
- 10.

9. H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe

15. 2 g de DFC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OMe se disuelven a 45° en 40 cc de ácido acético glacial al 80 % y a continuación se deja reposar durante 1 hora a 45°. Se concentra a continuación en vacío a un volumen de unos 10 cc y se liofiliza. El residuo se disuelve, para la eliminación total del ácido acético, en 15 cc de terc. butanol y 1,5 cc de agua y nuevamente se liofiliza. Se obtiene un residuo pulverulento que se disuelve en 5 cc de metanol y 20 cc de éster acético y se vuelve a precipitar mediante adición de 150 cc de éter de petróleo. Después de dejar reposar brevemente a 0° se vuelve a separar por filtración, se lava con éter de petróleo y se seca. Se obtiene un polvo amorfo del p.f. 180° que como únicas impurezas contiene aún huellas de 2-(p-bifenilil)-propanol(-2). El hexapéptido se emplea en esta forma para su ulterior ele-
- 20.
- 25.



boración. Este muestra en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice los siguientes valores Rf:

en cloroformo-acetona (1:1) Rf = 0,48

en cloroformo-metanol (9:1) Rf = 0,54

5. en tolueno-acetona (1:1) Rf = 0,49

10. H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH

10. 1,4 g de hexapéptido-metiléster de 9) se disuelven a 45° en 16 cc de metanol al 90 %, se enfría a 20° (con lo que el péptido se vuelve a precipitar parcialmente) y se mezcla con 4,32 cc de lejía sódica 1-N. La suspensión se agita durante 25 minutos a 22° (después de unos 15 minutos se ha disuelto todo en forma clara) y entonces se precipita el hexapéptido mediante adición de 4,32 cc de ácido clorhídrico 1-N y 30 cc de agua como precipitado finamente caposo.

15. Se deja reposar aún durante 15 minutos a 0°, se filtra, y se lava con agua hasta que el filtrado esté libre de iones de cloruro. Después de secar sobre hidróxido potásico y pentóxido fosfórico se obtienen 1,3 g de producto en bruto que, para su limpieza, se homogeniza durante 5 minutos a 80° con una mezcla de 25 cc de dimetilformamida y 60 cc de benceno y se precipita mediante adición de 120 cc de éter de petróleo. Después de dejar reposar durante 10 minutos a 0° se separa por filtración, se lava con benceno y éter de petróleo y se seca. El derivado hexapéptido así obtenido, cromatográficamente puro, muestra un punto de descomposición de unos 210° y en muchos disolventes es de difícil solubilidad. En la cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice es

20. Rf 45 = 0,39

25. Rf 52 = 0,77

30. Rf 100 = 0,47.



11. BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-
Met-Leu-Gly-OH

5. 1,04 g de BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂ se disuelven en 8 cc de dimetilformamida absoluta, se enfría a -25° y a esto se gotean lentamente 0,92 cc de ácido clorhídrico 3,6-N en dioxano, después 0,179 cc de terc.butilnitrito. Esta mezcla se agita durante 15 minutos a -10° y se enfría a -15° y con una pipeta se introduce en una solución enfriada a -15° de 878 mg de H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-
10. Met-Leu-Gly-OH y 0,588 cc de trietilamina en 12 cc de dimetilformamida absoluta. Se agita durante unos 10 minutos a -10° y durante 3 horas a 0°. Para mantener una reacción debilmente básica (pH aproximadamente de 8) se agregan
15. al principio aún dos veces, cada una 0,065 cc de trietilamina. La mezcla se deja reposar durante 15 horas a 0° y después se concentra por evaporación en alto vacío hasta obtener una consistencia en forma de pulpa. Después de agregar 50 cc de metanol se precipita el derivado deca péptido. La suspensión se calienta durante 5 minutos a 40°, se deja reposar durante 10 minutos a 10°, se separa por filtración
20. y el precipitado se lava con 20 cc de metanol. Al secar en alto vacío sobre hidróxido potásico y pentóxido de fósforo se obtiene el derivado deca péptido del punto de descomposición inexacto en unos 220-230°. Este muestra en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice los siguientes
25. valores Rf:

en el sistema cloroformo - metanol (8:2) Rf = 0,28
en el sistema 70 Rf = 0,55



en el sistema 104 $R_f = 0,75$
en el sistema 121 A $R_f = 0,59.$

12. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH

5. 1,7 g de BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH se disuelven en 170 cc de dimetilformamida caliente y después de enfriar a temperatura ambiente se gotea, en el transcurso de 1 hora, a una solución intensamente agitada de 2,5 g de yodo en 500 cc de metanol. A continuación se agita aún durante otra hora y se descolora entonces la solución enfriada a 0° casi totalmente con tiosulfato sódico 1-N. Después de concentrar la solución por evaporación en vacío, finalmente en alto vacío a 40°, a unos 100 cc de precipitado totalmente con éter, solidificando rápidamente el aceite precipitado. Después de separar la solución etérica se seca el residuo brevemente en vacío y después se frota con agua. El derivado deca péptido precipitado se filtra en vacío, se lava con agua y se seca. Para su limpieza se disuelve en 25 cc de cloroformo, se separa por filtración del poco material insoluble, el filtrado se concentra por evaporación aproximadamente a la mitad y se precipita con hexano. Se obtiene el derivado deca péptido puro que, en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice, muestra el R_f 100 = 0,48.
- 10.
- 15.
- 20.

25. 13. Z-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

30,3 g de Z-Asp(OtBu)-ONP y 18,3 g de H-Phe-OCH₃, HCl se disuelven juntos en 150 cc de dimetilformamida y se



- gotea a la solución clara de 11,8 cc de trietilamina. La suspensión formada se agita durante 20 horas a temperatura ambiente con lo que se tiñe amarillo intenso. A continuación se concentra, por evaporación en vacío, a unos 100 cc y en un litro de éster acético/cloroformo (4:1) se agita tres veces con ácido cítrico al 5 %, 19 veces con carbonato sódico aproximadamente 2-N y con solución de sal común saturada hasta que la reacción sea neutra. El producto en bruto, un aceite amarillo, se trata en éter con carbón activo y después de inyectar se cristaliza en 650 cc de éter/hexano (1:1) en la nevera. Se forman cristales incoloros en forma de agujas del p.f. 74,5 - 76,5°. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el valor Rf en el sistema cloroformo-metanol (95:5) = 0,74, en cloroformo-acetona (75:25) = 0,65.
5. 10. 15.

14. H-Asp(tBu)-Phe-OCH₃

- 48,6 g de Z-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se descarbobenzoxilizan en 700 cc de metanol, después de agregar 33,5 cc de ácido clorhídrico 3-N en dioxano y 5 g de catalizador de paladio sobre carbón al 10 %, en el matrón de agitación a temperatura ambiente. Terminada la recepción de hidrógeno se filtra y se evapora. Se obtienen 38,7 g de una espuma blanca. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en cloroformo-metano (9:1) es el Rf = 0,60; en cloroformo-acetona (1:1) es el Rf = 0,58; Rf 102E = 0,42. El producto se emplea sin ulterior limpieza para la siguiente condensación.
20. 25.



AGS. 1980

15. Z-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

38,6 g del H-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃,HCl obtenido se disuelven con 42,0 g de Z-Gln-ONP en 170 cc de dimetilformamida a una solución clara, ligeramente amarilla y, bajo agitación se mezcla lentamente con 13,9 cc de trietilamina. Se forma una suspensión naranja que se agita durante 24 horas a una temperatura del baño de 30-35°. Durante este tiempo se agregan otros 40 cc de dimetilformamida y además 1,39 cc de trietilamina.

10. Para la elaboración se disuelve el preparado en 4 litros de cloroformo y en un sistema de aparatos de distribución en contra-corriente de 20 escalones (volumen de fase inferior 400 cc, fase superior 200 cc por recipiente) se lava consecutivamente con 1 litro de solución al 5 % de

15. ácido cítrico, 400 cc de solución saturada de sal común, 6 litros de sosa 2-N y 2,8 litros de solución saturada de sal común. Después de secar y evaporar cristaliza el derivado tripéptido en 1,8 litros de etanol lentamente en la nevera. Se obtiene el Z-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ del p.f. 186-188°.

20. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf:

	en cloroformo-metanol (9:1)	Rf = 0,39;
	en cloroformo-acetona (1:1)	Rf = 0,24;
25.	en el sistema 102E	Rf = 0,69;
	en el sistema 89	Rf = 0,46;
	en el sistema 43A	Rf = 0,65

$[\alpha]_D^{20} = -28^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (c = 1,3 % en dimetilformamida).



16. H-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

- 7,55 g de Z-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se disuelven en 400 cc de metanol, se mezcla con 4,1 cc de ácido clorhídrico 3-N en dioxano y en presencia de 2 g de carbón de paladio (10 % de Pd) se hidrogena. Después de separar el catalizador por filtración en vacío y evaporar se obtiene el H-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃,HCl como espuma incolora. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf: en cloroformo-metanol (9:1) Rf = 0,13; en cloroformo-acetona (25:75) Rf = 0,14; en el sistema 102 E Rf = 0,22.

17. Z-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

- Toda la cantidad del hidrocloreuro de 16) se disuelve junto con 7,4 g de Z-Thr(tBu)-OSU en 14 cc de dimetilformamida a temperatura ambiente y a esta solución se gotean, bajo enfriamiento en el baño de hielo, 1,72 cc de trietilamina. A continuación se agita la suspensión marroñada durante 20 horas a temperatura ambiente. Después de la elaboración usual en mucho éster acético (cada vez lavando tres veces con ácido cítrico al 5 % y carbonato sódico aproximadamente 2-N, lavado neutro con solución saturada de sal común, secado sobre sulfato sódico y evaporación en vacío a 30-40°) se trata el producto en bruto en etanol con carbón activo y se cristaliza en 90 cc de etanol en la nevera. P.f. 155-161°.

En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice se obtuvieron los siguientes valores Rf:



24

- en cloroformo-metanol (9:1) $R_f = 0,52$;
en ciclohexano-acetona (3:7) $R_f = 0,48$
en el sistema 89 $R_f = 0,48$
en el sistema 121A $R_f = 0,76$
5. $[\alpha]_D^{20} = -4^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ($c = 2,3\%$ en dimetilformamida).

18. H-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

- 478 mg de Z-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se hidrogenan en 150 cc de metanol con 100 mg de carbón de palladio (al 10 %) a temperatura ambiente y neutro. Se obtienen 395 mg de una espuma incolora de H-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃, que, sin ulterior limpieza, se emplea para la siguiente condensación.
- 10.

En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice se obtienen los siguientes valores R_f :

15. en cloroformo-metanol (1 : 1) $R_f = 0,75$;
en cloroformo-metanol (9:1) $R_f = 0,17$;
en acetona $R_f = 0,18$;
en el sistema 102E $R_f = 0,23$;
en el sistema 89 $R_f = 0,12$.

20. 19. Z-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

- 687 mg de Z-Tyr(tBu)-OH-sal diciticlohexilamónica se agitan en cloroformo con ácido cítrico acuoso y el ácido libre obtenido, un aceite claro, se mezcla en 6,5 cc de tetrahidrofurano con 0,139 cc de N-metilmorfolina.
25. A -22° se agregan 0,170 cc de cloroformo de isobutilo y se agite durante media hora a -22 hasta -10° . Después se

21 ABO. 48



- gotes el sistema H-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ arriba descrito, disuelto en 15 cc de tetrahidrofurano y enfriado previamente, y se enjuaga con 5 cc del mismo disolvente. Después de 1/2 hora a -10° se agita aún durante 15 horas a temperatura ambiente. Después se concentra por evaporación en vacío y se elabora en éster acético en la forma usual (véase 17). El producto en bruto se disuelve en 15 cc de éster acético, se precipita con 40 cc de éter y a continuación se cristaliza en la nevera con metanol. Se obtienen agujas cortas, gruesas, que al secar en alto vacío a 50° se descomponen. P.f. 169-173°.
- 5.
- 10.

En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf:

- | | | |
|-----|--|------------|
| | en cloroformo-metanol (9:1) | Rf = 0,46; |
| 15. | en cloroformo-metanol (1:1) | Rf = 0,95; |
| | en cloroformo-acetona (1:1) | Rf = 0,44; |
| | en el sistema 89 | Rf = 0,61; |
| | en acetona | Rf = 0,68; |
| | en el sistema 10ZE | Rf = 0,73 |
| 20. | $[\alpha]_D^{21} = -54^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ (c = 2,0 % en dimetilformamida). | |

20. H-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

- 2,36 g de Z-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se hidrogenan en 450 cc de metanol con 500 mg de carbón de paladio al 10 % en la forma usual a temperatura ambiente. Se obtiene una espuma incolora que según el cromatograma de capa delgada es unitaria y como tal se sigue empleando. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf:
- 25.



en cloroformo-metanol (95:5) $R_f = 0,22$;
en el sistema 89 $R_f = 0,42$.

21. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

5. El producto de 20 se disuelve junto con 1,48 g de Z-Thr(tBu)-OSU en 3 cc de dimetilformamida y se agita durante 21 horas a temperatura ambiente. Después de diluir la solución de reacción con mucho éster acético se elabora en la forma usual (véase 17). El producto en bruto se disuelve en caliente en 30 cc de éster acético-metanol (9:1) y después de enfriar en el baño de hielo se precipita con 80 cc de éter. Se obtiene el producto como polvo incoloro, amorfo, del p.f. 146-148^o. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice se obtienen los siguientes valores R_f :

15. en cloroformo-metanol (9:1) $R_f = 0,55$;
en cloroformo-acetona (1:1) $R_f = 0,60$;
en el sistema 89 $R_f = 0,43$;

$$[\alpha]_D^{21} = +6 \pm 0,5^p \quad (c = 2,0 \text{ en dimetilformamida}).$$

22. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-NH-NH₂

20. 1,91 g de Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se disuelven en 80 cc de metanol y se mezcla con 8 cc de hidrato de hidrazina. Después de dejar reposar durante 22 horas a temperatura ambiente se aisla el producto precipitado y se seca en alto vacío a 60^o. Se obtiene la hidrazida microcristalina del p.f. 229-229^o (descomposición).

25. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de



21 AGO 1968

sílice se obtienen los siguientes valores Rf:

en cloroformo-metanol (9:1) Rf = 0,32;

en ciclohexano-acetona (3:7) Rf = 0,23

en el sistema 89 Rf = 0,34.

5. $[\alpha]_D^{20} = +4^\circ \pm 1^\circ$ (c = 1,0 en dimetilformamida).

23. Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-OMe

5,4 g de H-Lys(BOC)-Phe-His-OMe (véase el ejemplo 1) y 4,5 g de Z-Asn-ONP se agitan en 20 cc de dimetilformamida durante 20 horas a temperatura ambiente. Después de agregar éster acético se precipita el derivado del péptido, se separa por filtración y se lava con éter. Después de recristalizar en metanol funde el producto a 182-183°.

10.

En el cromatograma de capa delgada es el Rf₁₀₀ = 0,57 (en gel de sílice). $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida).

15.

24. Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-NH-NH₂

3,97 g de Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-OMe se disuelven en 8 cc de dimetilformamida caliente y 12 cc de metanol. A la solución aún caliente a 30° se agregan 2,5 cc de hidrato de hidrazina y se deja reposar durante 20 horas a temperatura ambiente. Después de agregar agua se precipita el hidrazido del péptido, se separa por filtración y con agua se lava hasta estar libre de hidrazina. El producto se recristaliza en etanol; p.f. 200 - 201°. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf₄₃₀ = 0,5.

20.

25.

25. H-Phe-Pro-OH

Z-Phe-Pro-OH se transforma por reducción catalítica.



ca (carbón Pd) en metanol-agua (4:1) en el dipéptido libre. Este se obtiene, después de concentrar por evaporación la solución de hidrogenación liberada del catalizador, a un pequeño volumen mediante adición de acetona, en forma cristalina y esto como monohidrato del dipéptido del p.f. 125 - 128.

26. Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-OH

20,2 g de Z-Thr(tBu)-OSU, 13,3 g de H-Phe-Pro-OH (monohidrato) y 6,54 cc de trietilamina se disuelven en 80 cc de dimetilformamida, se deja reposar durante la noche a unos 20° y después se concentra en alto vacío hasta formar una masa pegajosa. Esta se disuelve en 500 cc de éster acético y se lava cinco veces, cada una con 100 cc de solución al 5 % de ácido tártrico y a continuación con agua hasta estar neutro. La fase orgánica se concentra por evaporación hasta sequedad y la espuma residual sólida se pulveriza y se seca en alto vacío a 40°. Disolviendo y precipitando dos veces en éster acético-éter de petróleo se obtienen 13,3 g de derivado del tripéptido amorfo, cromatográficamente puro con una zona de fusión inexacta en unos 75-85°. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el $Rf_{115} = 0,68$; $Rf_{121A} = 0,57$.

27. Z-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe

1,36 g de H-Ala-Ile-Gly-OMe (véase el ejemplo 1) y 2,5 g de Z-Thr(tBu)-OSU se agitan en 3 cc de dimetilformamida durante 20 horas a temperatura ambiente. El derivado del tetrapéptido se precipita con éter, se separa por fil-



ABO. 1968

ción y se lava con éter. Después de recrystalizar en etanol es el p.f. = 229-230°. $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ (c = 1 en metanol). Rf = 0,55 en el sistema cloroformo-metanol (95:5) sobre gel de sílice.

5.

28. H-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe

5,66 g del compuesto carbobenzoxi de arriba se disuelven en 400 cc de metanol caliente y en presencia de 1 g de carbón de paladio (10 % de Pd) de hidrogeno. Después de separar el catalizador por filtración se evapora el metanol en vacío a 40°. El residuo sólido se sigue elaborando inmediatamente. Rf = 0,2 en el sistema cloroformo-metanol (95:5) en gel de sílice)

10.

29. H-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

4,3 g del éster metílico del tetrapéptido se disuelven en 43 cc de metanol bajo débil calentamiento. Después de enfriar a 20° se agregan 12 cc de lejía sódica 1-N. Después de 5 minutos se agregan 20 cc de agua y después de otros 10 minutos 12 cc de ácido clorhídrico 1-N y 20 cc de metanol. El precipitado cristalino se separa por filtración y se lava con etanol al 90 %. Funde a partir de 240° bajo descomposición. Rf₁₀₀ = 0,15 en gel de sílice.

15.

20.

30a. Z-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

El derivado del tetrapéptido (4,2 g) descrito bajo 29) se suspende en 110 cc de dimetilformamida al 90 %, se mezcla con 1,4 cc de trietilamina y se calienta a 70° hasta que se haya disuelto la cantidad principal. Después de enfriar a 25° se agregan 4,8 g de Z-Gln-ONP, se agita durante

25.



AGO 1968

- 18 horas a temperatura ambiente, se agregan otros 2,4 g de Z-Gln-ONP y 0,7 cc de trietilamina y se agita aún durante 20 horas a 50°. El producto precipitado se separa por filtración, la lejía madre se mezcla con éter y el producto precipitado es asimismo aislado. Ambas fracciones se suspenden juntas en 60 cc de t-butanol, después de agregar ácido clorhídrico 2-N hasta un pH 2 se frota bien y después se precipita agregando en porciones un total de 600 cc de agua. El producto se separa por centrifugación, se lava aún dos veces, cada una con 200 cc de agua, y se liofiliza. Se puede recristalizar de mucho metanol. P.f. a partir de 230° bajo descomposición. El producto contiene 5 Mol de agua. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el $Rf_{100} = 0,4$.
- 5.
- 10.
15. 30b. Z-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe
4,6 g del H-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe descrito bajo 28) en 30 cc de dimetilformamida se mezclan con 3,5 g de Z-Gln-ONP y se agita a temperatura ambiente hasta que la mezcla solidifique. Después de dejar reposar durante la noche se diluye con éter, el precipitado se separa por filtración y con éter se lava hasta estar libre de nitrofenol. El pentapéptido protegido muestra en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice el $Rf = 0,14$ en el sistema cloroformo-metanol (95:5). P.f.: 250°
- 20.
- 25.
- 31a. H-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH, HCl
3,7 g de Z-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH se suspenden en 150 cc de metanol al 80 % y 5,5 cc de ácido clorhídrico



15. drico l-H y se hidrogena en presencia de 2 g de carbón de paladio (al 10 %), hasta que la sustancia se haya disuelto y no se observe ninguna recepción más de hidrógeno. Después de separar el catalizador por filtración se concentra fuertemente el filtrado por evaporación en vacío, se diluye con t-butanol y se liofiliza. En el cromatograma sobre gel de sílice es el $Rf_{101} = 0,48$.

31b. H-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe, HCl

10. 14,4 g del derivado pentapéptido descrito bajo 30b) se suspenden en 800 cc de metanol al 80 % y se calienta durante algún tiempo a 50° . La suspensión se enfría a temperatura ambiente, se mezcla con 20,8 cc de ácido clorhídrico y 3 g de carbón de paladio (al 10 %) y se hidrogena hasta que haya terminado la recepción de hidrógeno y el producto de partida se haya disuelto. Después de separar el catalizador por filtración se evapora el filtrado en vacío a 40° y el residuo se deshidrata evaporando dos veces con dimetilformamida en alto vacío. El residuo se emplea sin ulterior limpieza. $Rf_{100} = 0,33$ en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice.

215.

20.

32. Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe

25. 12,0 g del hidrocloreuro del pentapéptido-metiléster descrito bajo 31b) se disuelven en 80 cc de dimetilformamida. Consecutivamente se agregan, bajo agitación y a temperatura ambiente 13,3 g de Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-OH y 5,75 g de N-hidroxisuccinimida, después, a 0° 2,76 cc de



21 AGO. 1960

trietilamina y 6,2 g de dicitohexilcarbodiimida. Se agita a 0° hasta que la mezcla se espese, después se deja reposar durante la noche a 0°. Después de concentrar en alto vacío por evaporación a unos 50 cc se precipita el producto con 300 cc de éter. El material aislado se lava con ácido cítrico 0,05-N y agua y se seca en alto vacío a 40°. Se limpia mediante recristalización en 1 litro de isopropanol. Se obtienen 18,2 g del derivado de octapéptido protegido. Rf 89 = 0,27 en el cromograma de capa delgada sobre gel de sílice.

10.

33. Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

10,9 g del octapéptido-metiléster descrito bajo 32) se disuelven en 190 cc de metanol al 90 % bajo calentamiento a 70°. Después de enfriar a temperatura ambiente se agregan 30 cc de lejía sódica 1-N y 10 minutos más tarde 160 cc de agua en pequeñas porciones. Se filtra para aclarar y del filtrado se precipita el producto vertiendo en 600 cc de ácido clorhídrico 0,05-N enfriado con hielo. El precipitado se separa por filtración y se lava neutro con agua. El producto, unitario en el cromograma de capa delgada sobre gel de sílice (Rf 100 = 0,45) se puede recristalizar en metanol-agua.

15.

20.

25.

34. H-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

3,6 g del Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH obtenido bajo 33) se disuelven en 100 cc de ácido acético al 80 % y la solución se hidrogena en presencia de 0,5 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la re-



5. cepción de hidrógeno se separa por filtración en vacío del catalizador y la solución se evapora hasta sequedad. La sal ácido acético del derivado octapéptido obtenida como escarchilla incolora se seca en alto vacío. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el R_f 100 = 0,21.

35. Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-
Ala-Ile-Gly-OH

10. 11,25 g de Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-hidrezida, disueltos en 65 cc de dimetilformamida, se mezclan a -20° hasta -25° en el plazo de 2 minutos con 8,4 cc de ácido clorhídrico 4,2-N en dioxano. A continuación se agregan a -15° hasta -20° 2,1 cc de terc.butilnitrito y se deja reposar durante 15 minutos a -15° . Después de enfriar a -20°

15. se agregan 4,8 cc de trietilamina, después una solución de 9,0 g del producto descrito bajo 34) en 210 cc de dimetilformamida al 90%. Enfriando fuertemente se mantiene una temperatura interior de -15° . En el transcurso de una hora se calienta a 0° manteniéndose el pH en 7-8 agregando ocasionalmente trietilamina. En total se agregan aún 3,5 cc

20. de trietilamina. Después de agitar durante la noche a 0° se vierte en 3 litros de éter, el precipitado coposo se separa por filtración y se lava dos veces con éter y una vez con agua. El producto en bruto se disuelve en 500 cc de metanol caliente y se vuelve a precipitar vertiendo en 1,5

25. litros de ácido acético al 1%. El producto separado por filtración y lavado dos veces con agua se vuelve a disolver y precipitar en igual forma. R_f 100 = 0,33 (en placas de gel de sílice).



36. H-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-
Ala-Ile-Gly-OH

5. 1,7 g del dodecapéptido protegido de arriba se disuelven en 100 cc de ácido acético al 80 % y en presencia de 0,5 g de carbón de paladio (10 % Pd) se hidrogena en la forma usual. Después de separar del catalizador por filtración se concentra fuertemente por evaporación en alto vacío a 30° y el residuo se liofiliza con terc.butanol. El producto obtenido en rendimiento cuantitativo, unitario

10. en el cromatograma de capa delgada (Rf 100 = 0,1 sobre gel de sílice) se sigue elaborando inmediatamente.

37. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

15. 1,75 g del derivado de péptido descrito bajo 22) se disuelven a 50° en 10 cc de dimetilformamida. Después de enfriar a -20° se gotean 0,9 cc de ácido clorhídrico 4,2-N en dioxano. Entonces se agregan a -15° 0,22 cc de terc.butilnitrito y se deja reaccionar durante 15 minutos

20. a -15°. Se vuelve a enfriar entonces de nuevo a -20° y se gotean 0,53 cc de trietilamina y después una solución de 1,6 g del derivado de péptido descrito bajo 36) en 40 cc de dimetilformamida al 90 %. Se aumenta la temperatura en el plazo de 1 hora a 0° manteniéndose el pH en 7-8 agregando en porciones trietilamina. En total se agregan 0,25

25. cc de trietilamina. Después de agitar durante otras 15 horas a 0° se precipita el producto vertiendo en éter, el precipitado se separa por filtración y se lava con éter y agua.



5. Para limpiar se disuelve y precipita una vez en dimetilformamida-éster acético y una vez en dimetilformamida-ácido clorhídrico 0,02-N. El material puro muestra en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice el R_f 100 = 0,40.

38. Z-Ala-Pro-NH₂

10. 2,28 g de H-Pro-NH₂ y 7,57 g de Z-Ala-ONP se disuelven en 20 cc de dimetilformamida y la solución amarilla se deja reposar durante 18 horas a temperatura ambiente. Después se evapora en alto vacío hasta sequedad, el residuo se mezcla con éter y el polvo que se forma se frota intensamente. Después de separar por filtración en vacío y secar se obtienen 5,5 g de Z-Ala-Pro-NH₂ del p.f. 167,5 - 168,5°. $[\alpha]_D^{20} = -74^\circ$ (c = 1 en metanol).

15.

39. Z-Gly-Ala-Pro-NH₂

20. 27,1 g del derivado del dipéptido de arriba se disuelven en 425 cc de etanol y después de agregar 85 cc de ácido clorhídrico acuoso 1,0-N se hidrogena en presencia de 4,25 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la hidrogenación se evapora la solución en vacío a una temperatura del baño de 40-50°. El residuo se disuelve a 40° en 40 cc de dimetilformamida y la solución se enfría a 20°. Después se agregan 29,1 g de Z-Gly-ONP y después de disolver se gotean bajo agitación, en el plazo de 45 minutos, 11,2 cc de trietilamina absoluta. Después se agita durante 20 horas a temperatura ambiente. La suspensión se

25.



54. evapora a 40° y 0,01 Torr y el residuo se reparte entre 600 cc de agua y 300 cc de éter. La capa acuosa se extrae dos veces, cada una con 300 cc de éter y la capa etérea dos veces, cada una con 300 cc de agua. Las fracciones acuosas se evaporan conjuntamente en vacío a $40-50^{\circ}$ y agregando varias veces cloroformo y evaporando se libera del agua. El residuo bien secado se recoge a $40-50^{\circ}$ en 500 cc de éster acético, el hidrocioruro de la trietilamina insoluble se separa por filtración y el filtrado se mezcla a $30-40^{\circ}$ con 10 cc de éter, con lo que se presenta la cristalización. Después de reposar durante unas 20 horas a $+5^{\circ}$ hasta $+10^{\circ}$ se vislan los cristales, se lava y se seca. P.f. $105-106^{\circ}$. El producto contiene un 3 % de hidrocioruro de trietilamina. Este se puede seguir reaccionando en esta forma.
10. Para la limpieza se disuelven 5,0 g del cristalizado en bruto de arriba en 10 cc de agua y después de agregar 20 cc de cloruro metilénico se mezcla con 15 cc de solución saturada de carbonato potásico. La capa orgánica se separa, se extrae con 10 cc de solución saturada de carbonato potásico, la capa acuosa se extrae con 15 cc de cloruro metilénico. Las soluciones cloruro metilénicas reunidas se secan con sulfato sódico anhidro y se evapora. El residuo se cristaliza en 50 cc de éster acético. Se obtienen 4,4 g de derivado tripéptido del p.f. $109-112^{\circ}$.
15. Después de cristalizar en acetona-metanol-éter (10:4:6) se obtienen cristales del p.f. $144,5 - 145,5^{\circ}$ (polimorfia cristalina). $[\alpha]_D^{20} = -93^{\circ}$ (c = 1,0 en metanol).
20. Después de cristalizar en acetona-metanol-éter (10:4:6) se obtienen cristales del p.f. $144,5 - 145,5^{\circ}$ (polimorfia cristalina). $[\alpha]_D^{20} = -93^{\circ}$ (c = 1,0 en metanol).
25. Después de cristalizar en acetona-metanol-éter (10:4:6) se obtienen cristales del p.f. $144,5 - 145,5^{\circ}$ (polimorfia cristalina). $[\alpha]_D^{20} = -93^{\circ}$ (c = 1,0 en metanol).

En la cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice en cloroformo + metanol (8:2) es el $R_f = 0,38$.



40. H-Gly-Ala-Pro-NH₂

5. 18,8 g del derivado de tripéptido-amida en bruto obtenido bajo 39) se disuelven en 400 cc de dimetilformamida y se hidrogena en presencia de 1,0 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la hidrogenación se filtra y la solución, después de desgasificar brevemente, se emplea en la etapa siguiente.

41. Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

10. A la solución del tripéptido-amida obtenida bajo 40) se le agregan 20,1 g de Z-Val-p-nitrofeniléster y la mezcla se deja reposar durante 18 horas a temperatura ambiente. Después se evapora a 50-60° y 0,01 Torr hasta sequedad, el residuo se frota con 300 cc de éter y se filtra. El residuo de filtración se seca y en 210 cc de etanol absoluto se agita durante 15 minutos a 70-80°, se enfría a 0° y se filtra. El residuo se cristaliza en una mezcla de 170 cc de tetrahidrofurano absoluto, 25 cc de agua y 110 cc de éter. P.f. = 209-211°. Valor Rf sobre placas de gel de sílice = 0,42 en cloroformo-metanol (8:2).

20. 42. H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

25. 1,1 g de Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se disuelven en 50 cc de metanol al 80 % y la solución se hidrogena en presencia de 0,3 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la recepción de hidrógeno se separa el catalizador por filtración en vacío, la solución se evapora y el residuo se seca en alto vacío a una temperatura del baño de 35°. Se obtiene así el tetrapéptido H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ como



sustancia incolora, valor Rf = 0,20 (placas de gel de sílice, sistema cloroformo-metanol = 1:1).

43. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂
- 5.

800 mg del derivado de péptido descrito bajo 37), 500 mg de H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ y 170 mg de N-hidroxisuccinimida se disuelven en 10 cc de dimetilformamida, se concentra por evaporación en alto vacío a aproximadamente la mitad y se mezcla con 250 mg de dicitclohexilcarbodiimida. Después de agitar durante la noche a temperatura ambiente se precipita con éter y el material se aisla. Se limpia mediante distribución de Craig en la mezcla de metanol-tempón (como en el ejemplo 3, 12)-cloroformo-tetraclorocarbono (10:3:5:6), K = 0,29. El producto aislado de la distribución, puro, muestra en el cromatograma de capa delgada Rf 107 = 0,62 (sobre placas de gel de sílice).

10.

15.

44. H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂
- 20.

300 mg del derivado de péptido de arriba se disuelven en 30 cc de ácido acético al 80 % y se hidrogena en presencia de 100 mg de carbón de paladio (10 % de Pd). Terminada la descARBObenzoxilización se separa el catalizador por filtración, el filtrado se concentra fuertemente por evaporación en alto vacío a 30° y el residuo se liofi-

25.



- liza en terc.butanol. El residuo se disuelve en 10 cc de metanol, mediante adición de bicarbonato sódico l-N se pone debilmente alcalino y se precipita gotesndo en carbonato potásico O,l-n. El producto aislado se vuelve inmediatamente a disolver y precipitar. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 100 = 0,34.
- 5.
45. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂
- 10.
- 288 mg del producto de arriba, 181 mg del derivado de péptido descrito bajo 12) y 46 mg de N-hidroxisuccinimida se disuelven en 2 cc de dimetilformamida a 45° conduciendo por encima nitrógeno. Después de agregar 52 mg de dicitohexilcarbodiimida se agita aún durante 3 horas a 45°, después se precipita con éter libre de peróxido y el producto se aísla. Se limpia mediante una distribución de Craig en el sistema metanol-tempón (como en el ejemplo 3 bajo 12)-cloroformo-tetraclorocarbono (11:3:6:7); K = 0,74. El producto puro aislado de la distribución muestra en el cromatograma de capa delgada Rf 52A = 0,5; Rf 100 = 0,35 (sobre gel de sílice).
- 15.
- 20.

Ejemplo 3

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asn-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (Asn¹⁵-calcitonina M)



53 mg de BOC-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ finisimamente pulverizado se disuelven a 0° en 2 cc de ácido clorhídrico concentrado y se agita durante 5 minutos. Después se retira el ácido clorhídrico, disuelto en forma gaseosa, en alto vacío durante 5 minutos, se diluye con 4 cc de agua enfriada con hielo y el producto se transforma en la sal ácido acética en una pequeña columna de Amberlite CG-45 (intercambiator de iones debilmente básico en forma de acetato) y se liofiliza. Se obtiene el producto en forma de un liofilizado incoloro.

10. En el espectro ultravioleta en ácido acético al 10 % es $\lambda_{max} = 275 \text{ nm}$ ($\epsilon = 1700$). En el cromatograma de capa delgada en celulosa (Selecta) es el Rf 45 = 0,48, Rf 101A = 0,49; en óxido de aluminio (Alox, Camag) es el Rf 79 = 0,57.

20. En la electrofóresis se traslada la sustancia a 280 V en 1,5 horas sobre placas de celulosa Selecta en dirección hacia el cátodo a un pH = 1,9 (ácido acético-tempón ácido fórmico) : 3,5 cm.

El producto de partida se puede preparar como sigue:

1. Z-Gln-Asn-Phe-OCH₃

25. 14,5 g de Z-Gln-ONP se disuelven junto con 10,8 g de H-Asn-Phe-OCH₃, hidrocioruro (Ann. 688, 259 /1965/) en 100 cc de dimetilformamida y lentamente se mezcla con



- 4,55 cc de trietilamina. Se forma una pasta espesa que se diluye con 50 cc de dimetilformamida. Después de reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente se filtra y el residuo se lava con dimetilformamida. El Z-Gln-Asn-Phe-OMe así obtenido se puede recristalizar en mucha dimetilformamida caliente. P.f. 261-265° (decomposición).

$$[\alpha]_D^{20} = +11^{\circ} \quad (c = 0,94 \text{ en triamida heximetilfosfórica}).$$

2. H-Gln-Asn-Phe-OCH₃-hidrocloruro

- 14,1 g de Z-Gln-Asn-Phe-OCH₃ se hidrogenan en 800 cc de metanol bajo adición de 8,5 cc de ácido clorhídrico 3-N en dioxano y 2,4 g de carbón de paladio al 10 % a 45°. Terminada la recepción de hidrógeno se filtra y se evapora. El residuo se sigue empleando sin ulterior limpieza.

- En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 2A = 0,27; Rf 45 = 0,31; Rf 43E = 0,50.

3. Z-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃

- 9,3 g de H-Gln-Asn-Phe-OCH₃-hidrocloruro se disuelven con 11,9 g de Z-Thr(tBu)-OSU en 150 cc de dimetilformamida a una solución clara. A esto se gotean 2,85 cc de trietilamina en 10 cc de dimetilformamida y se agita durante 21 horas a temperatura ambiente. A continuación se concentra por evaporación en vacío, el residuo se recoge en mucho éster acético-cloroformo (9:1) y se agita con 2 x 200 cc de ácido cítrico al 5 % y 1 x 100 cc de agua. Ahora se separa por filtración del precipitado insoluble, el filtrado se agita aún con 2 x 200 cc de solución de sosa 2-N y



3 x 100 cc de agua, se seca con sulfato sódico y se evapora. El residuo de evaporación se recristaliza junto con el residuo de filtración arriba obtenido en dimetilformamida/éter (1:1). P.f. 237 - 241^o (descomposición);

5. $[\alpha]_D^{20} = +8^{\circ}$ (c = 1 % en dimetilformamida).

En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 52 = 0,59; Rf 102E = 0,59; en óxido de aluminio (Alox) es el Rf 43A = 0,59.

4. H-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃

10. 6,31 g de Z-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃ se hidrogenan neutro en 600 cc de metanol junto con 700 mg de carbón de paladio al 10 % a temperatura ambiente en un recipiente agitador. La sustancia se disuelve lentamente. El residuo de evaporación amorfo se emplea directamente en la siguiente condensación.

15.

En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 52 = 0,21, Rf 102A = 0,21; en óxido de aluminio es el Rf 43A = 0,19.

5. Z-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃

20.

Una solución de 5,9 g de Z-Tyr(tBu)-OH (liberada de 8,8 g de Z-Tyr(tBu)-OH-sal diciclohexilamónica) en 85 cc de tetrahidrofurano se mezcla con 1,84 cc de N-metilmorfina y a -33^o se hace reaccionar con 2,28 cc de clorofor-misto de isobutilo. Se agita durante media hora a -20 hasta -12^o y la solución enfríada a -10 del derivado tetrapéptido H-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃ en 25 cc de dimetilformamida se vierte y se enjuaga con 15 cc de dimetilformamida.

25.



5. Después de reaccionar durante 19 horas a temperatura ambiente se concentra por evaporación en vacío, se suspende en éster acético y se agita 3 veces con solución al 5 % de ácido cítrico, 3 veces con solución 2-N de sosa y 5 veces con solución semisaturada de sal común. Se separa por filtración del residuo en suspensión y se seca en alto vacío. El producto se puede cristalizar en metanol. P.f. 216 - 219°; $[\alpha]_D^{20} = +4^{\circ}$ (c = 1,0 en dimetilformamida)

10. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 52 = 0,64, Rf 102A = 0,70; en óxido de aluminio (Alox) es el Rf 43A = 0,65; Rf 89 = 0,17.

6. H-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃

15. 5,1 g de Z-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃ se descárbobenzoxilizan en 600 cc de metanol a temperatura ambiente con 800 mg de carbón de paladio al 10 % en la forma usual. El H-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃ obtenido muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice los siguientes valores:

20. Rf 89 = 0,15; Rf 102E = 0,28; Rf en cloroformo-metanol (9:1) = 0,11.

7. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃

25. El derivado de pentapéptido obtenido bajo 6, el H-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃ se disuelve con 4,3 g de Z-Thr(tBu)-OSU en 40 cc de dimetilformamida y se agita durante 18 horas a temperatura ambiente. La elocoración se efectua como bajo 5. El residuo de difícil solución en



éster acético se recristaliza en metanol. P.f. 206 - 208^o;
 $[\alpha]_D^{20} = +15^o$ (c = 1,7 % en dimetilformamida); en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 102E = 0,69; Rf 89 = 0,28; Rf en cloroformo-metanol (9:1) = 0,30.

5.

8. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-NH-NH₂

2,0 g de Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-OCH₃ se disuelven en 150 cc de metanol y se hace reaccionar con 10,7 cc de hidreto de hidracina durante 6 horas a temperatura ambiente. Se separa por filtración del precipitado, éste se lava con metanol y se seca en alto vacío sobre ácido sulfúrico concentrado. P.f. 231^o (descomposición); $[\alpha]_D^{20} = +4^o$ (c = 0,89 en dimetilformamida).

10.

En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 43C = 0,57; Rf 45 = 0,60; Rf 102E = 0,58.

15.

9. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

800 mg de Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-NH-NH₂ se disuelven en 18 cc de dimetilformamida, a -20^o se mezcla con 0,58 cc de ácido clorhídrico 3-N y se mezcla con dioxeno y con 0,16 cc de t-butilnitrito. Se agita durante 15 minutos a -20 hasta -15^o, se agregan después 0,30 cc de N,N-diisopropil-etilamina y 855 mg de H-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH (acetato) en 20 cc de dimetilformamida (al 90 %) y se agita a 0^o. Después de dos veces una hora se agregan cada vez 0,075 cc de N,N-diisopropil-etilamina (en total 0,15 cc) y se agita durante 15 horas a 0^o. El preparado se vierte y agita en

20.

25.



22 MAR 1960

600 cc de éter, se deja sedimentar el precipitado y se filtra en vacío. Para su limpieza se disuelve y precipita el producto en bruto una vez en dimetilformamida-éster acético y una vez en dimetilformamida-ácido clorhídrico acuoso 0,002-N.

5.

En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el Rf 43E = 0,62; Rf 100 = 0,32; Rf 45 = 0,53; Rf 3 = 0,27.

10. Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

10.

786 mg de Z-(Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH y 251 mg de H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se suspenden junto con 82 mg de N-hidroxisuccinimida en 10 cc de dimetilformamida y, bajo agitación, se mezcla a 40° con 90 mg de dicitclohexilcarbodiimida en 1 cc de dimetilformamida. Después de 3 horas a 40° se agregan otros 65 mg de dicitclohexilcarbodiimida y se agita durante un total de 21 horas a 40°. Se diluye con 10 cc de metanol y se introduce y agita en 350 cc de éter, se deja sedimentar el precipitado y se le separa por filtración. El precipitado se limpia mediante distribución según Graig en el sistema metanol-tampón-cloroformo-tetraclorocarbono (10:3:5:6, tampón como en el ejemplo 1 bajo 18).

15.

20.

25.

Después de 450 escalones se aisla la sustancia unitaria según el cromatograma de capa delgada (K = 0,66).



En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 3 = 0,40; Rf 45 = 0,42; Rf 100 = 0,32.

5. 11. H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

64 mg de Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se hidrogenan en 100 cc de ácido acético al 80 % en presencia de 16 mg de carbón de paladio al 10 %, a temperatura ambiente en un recipiente agitador durante 15 horas. Se filtra por aspiración del catalizador, éste se lava con la misma mezcla de disolventes y se liofiliza. Se obtienen 54 mg del docosapéptido-amida-acetato. Este se disuelve en 10 cc de metanol caliente, con algunas gotas de solución 1+N de bicarbonato sódico se ajusta a un pH de unos 7,5 y se introduce y agita en 50 cc de solución de sosa 0,1-N de 0°.

10.

15.

El precipitado lechoso se deja sedimentar, se separa por filtración en vacío, se lava con agua y se seca.

20. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 43E = 0,50; Rf 110 = 0,61; Rf 52 = 0,21.

25. 12. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asn-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

93 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH, 95 mg de H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-



5. Asn-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-
Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂, 14 mg de N-hidroxisuccini-
mida y 10 cc de dimetilformamida se agitan bajo nitrógeno
con 15 mg de dicitclohexilcarbodiimida. La mezcla de reac-
ción se agita a 40° durante un total de 20 horas, agregándo-
se después de 2 horas nuevamente 15 mg de dicitclohexilcarbodiimida. A continuación se introduce el preparado en 300
cc de éter absoluto, se deja reposar durante 2 horas en la
nevera, se separa por filtración en vacío el precipitado y
10. se le lava con éter. Para su limpieza se reparte multiplica-
tivamente el producto en bruto en el sistema metanol-tampón-
cloroformo-tetraclorocarbono (11:3:6:7, tampón como en el
ejemplo 1 bajo 18) a través de 220 escalones. Las fracciones
puras (recipientes 104-121; K=1,0) se reúnen, se evapora y
15. en alto vacío se libera a 40° del acetato amónico.

En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 45 = 0,60; Rf 96 = 0,59; Rf 100 = 0,32.

Ejemplo 4

20. Ac-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-
Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-
Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (N^α -acetil-calcitonina M)

25. 100 mg de Ac-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-
-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-
Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-
Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se reciben, bajo enjuagado con nitró-
geno, a 0° en 3 cc de ácido trifluoroacético al 95 % y después



21 JUN 1960

- de disolver totalmente se deja reposar durante 90 minutos a temperatura ambiente. A 0° se precipita con 50 cc de éter frío, la suspensión se centrifuga y el precipitado se frota aún dos veces con éter. El producto secado en alto vacío
5. El residuo sobre sosa cáustica se recoge, para su transformación en la forma de acetato, en 3 cc de agua, se pasa a una columna equilibrada con ácido acético 0,02-N de intercambiadores de iones debilmente básicos (por ejemplo, Merck; 7,5 mm, 20 cm) y se eluye con ácido acético 0,02-N. El eluado se
10. evapora en alto vacío a 25°, el residuo se recoge en agua y se liofiliza. El polvo blanco se somete, para su limpieza, a una distribución de Craig en el sistema n-butanol-ácido acético glacial-agua (4:1:5) (volumen de fases 3 cc). Después de 600 etapas se reúnen las fracciones que contienen
15. producto unitario según el cromatograma de capa delgada, se evapora en alto vacío a 25°, se recoge en agua y se liofiliza. Secando sobre sosa cáustica en alto vacío a temperatura ambiente se obtiene un polvo amorfo.

- En la electroforesis sobre "Selecta" (pH 1,9; 1½ horas- 280 V) se traslada el producto -1,8 cm, a un pH
20. de 4,8 - 1,2 cm. En el cromatograma de capa delgada sobre "Alox" es el Rf 52 = 0,65; Rf 79 = 0,60; Rf 45 = 0,72; sobre "Selecta" Rf 45 = 0,55; Rf 101A = 0,63; Rf 52 = 0,38.

- El producto de partida se puede obtener como sigue:
- 25.

1. TRI-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe

9,1 g de TRI-Cys(TRI)-OH y 3,2 g de H-Gly-Asn-Leu-



5. OMe se recogen en 60 cc de dimetilformamida y, bajo agitación, se mezcla a 0° con 3,7 g de dicitclohexilcarbodiimida. Después de 15 horas a 0° se separa por filtración de la dicitclohexilúrea, el filtrado se evapora hasta sequedad y el residuo se cristaliza en cloroformo-éter de petróleo. P.f. 126 - 130°. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf = 0,27 en el sistema cloroformo-metanol (95:5).

2. H-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe, acetato

10. 1,8 g de TRI-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe se disuelven en 16 cc de ácido acético glacial y a temperatura ambiente se mezcla, gota a gota, con 4 cc de agua. Después de una hora a temperatura ambiente se agregan 12 cc de agua, se filtra del tritilcarbinoel precipitado y el filtrado se evapora en alto vacío a 40° hasta sequedad. El residuo oleaginoso se recoge en terc.butanol y se liofiliza. Se obtiene un polvo blanco que en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice muestra el Rf = 0,45 en el sistema: cloroformo/metanol (8:2).

20. 3. Ac-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe

25. A 1,02 g de H-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe, acetato y 0,9 cc de ácido acético glacial en 15 cc de cloroformo se agregan a 0° 1,9 g de dicitclohexilcarbodiimida seco. Después de unos 10 minutos ha solidificado la mezcla de reacción a una pulpa. Esta se diluye con 10 cc de cloroformo y la mezcla se agita durante 4 horas a 0°. Después de agregar 30 cc de éter de petróleo se separa por filtración y el pre-



precipitado se recristaliza en cloroformo caliente. P.f. 156 - 158°. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf = 0,25 en el sistema cloroformo-metanol (9:1).

4. Ac-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂

5. Se mezclan 2,42 g de Ac-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe en 21 cc de dimetilformamida con 3,75 cc de hidrato de hidrazina y la solución clara se deja reposar durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se enfría a 0° y bajo agitación se agregan 150 cc de agua. El precipitado se separa por filtración, se lava con agua fría y se seca sobre pentóxido de fósforo. Para la limpieza se disuelve y precipita en metanol caliente. Rf 53 = 0,55 en el cromatograma de capa delgada con gel de sílice.
- 10.

5. Ac-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH

15. 1,44 g de Ac-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂ se disuelven en 10 cc de dimetilformamida y enjuagando con nitrógeno se mezcla a -10° con 2,5 cc de ácido clorhídrico 2,0-N en éster acético y 0,26 cc de t-butilnitrito. Después de 15 minutos a -10° se agrega una solución enfriada a -10° de 1,02 g de H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH (sal ácido acético) y 0,84 cc de trietilamina en 12 cc de dimetilformamida, gota a gota, de manera que la temperatura no sobrepase nunca los -10°. Se agite aún durante una hora a -10° y se deje reposar durante 24 horas a 0°. El producto se precipita en forma de gelatina. La mezcla de reacción
- 20.
- 25.



- se concentre por evaporación a unos 5 cc, se vuelve a precipitar totalmente mediante adición de 20 cc de metanol, se separa por filtración y se lava con dimetilformamida-metanol(1:1) frío. Después de frotar tres veces con agua frío y secar sobre sosa cáustica se disuelve y precipita una vez en dimetilformamida-metanol, con lo que se obtiene el producto de difícil solubilidad en forma pura. Rf = 0,25 en el sistema cloroformo-metanol (8:2) en gel de sílice.
- 5.
6. Ac-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH
10. Una solución de 410 mg de Ac-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH en 35 cc de dimetilformamida se gotea a temperatura ambiente, en el plazo de 15 minutos, a una solución fuertemente agitada de 1,0 g de yodo en 150 cc de metanol. Terminada la introducción se agita aún durante una hora, después se enfría a 0° y la solución de reacción se descolorea mediante adición gota a gota de solución 1,0-N de tiosulfato sódico. Al vacío de la trompa de agua a 30° se evapora primeramente el metanol y después, en alto vacío (30°) se concentra por evaporación a unos 10 cc y se mezcla con 200 cc de éter. Se decanta de la resina precipitada, se frota tres veces con éter y tres veces con agua y se seca en alto vacío sobre sosa cáustica. Para limpiar se disuelve en cloroformo, se filtra y el producto se precipita del filtrado mediante hexano.
- 15.
20. Rf 70 = 0,50; Rf 43C ≠ 0,35 en gel de sílice.

7. Ac-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-



(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-
Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-
Gly-Ala-Pro-NH₂

5. 116 mg de Ac-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys
Met-Leu-Gly-OH, 250 mg de H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-
Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-
Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ y 16 mg de N-hidro-
xisuccinimida se disuelven en 2 cc de dimetilformamida y se
agregan, a temperatura ambiente, 30 mg de dicitclohexilcar-
bodiimida seco y enjuagando con nitrógeno se deja reposar
10. durante 24 horas a 40°. Sin separarle de la dicitclohexilú-
rea por filtración se concentra el preparado en alto vacío
a un aceite y este se frota con metanol-éter (1:1) a un pol-
vo y se filtra. El producto se limpia disolviendo y preci-
pitando dos veces en metanol-éter. Rf 43E = 0,50; Rf 52A =
15. 0,30; Rf 100 = 0,32; Rf 107 = 0,65 en gel de sílice.

Ejemplo 5

20. Bmp-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-
Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-
Ala-Pro-NH₂ (Desamino-calcitonina M)

25. 50 mg de Bmp-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met
Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-
Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-
Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se mezclan enjuagando con nitróge-
no a 0° con 0,95 cc de ácido clorhídrico concentrado. Se de-
ja reaccionar aún durante 5 minutos, se pone entonces bajo



24 JUN 1968

agitación el recipiente de reacción bajo alto vacío, después de 5 minutos se agregan 40 cc de terc.butanol y se liofiliza. Se obtiene un polvo blanco voluminoso. En el cromatograma de capa delgada en celulosa es el Rf 45 = 0,54; Rf 52 = 0,34, en óxido de aluminio es el Rf 45 = 0,47, Rf 52 = 0,61 y Rf 79 = 0,66.

5. El producto tiene en la electrofóresis sobre celulosa "Selecta" 1440 (pH 1,9; 1½ horas, 280 V) un trayecto de recorrido de 1,8 cm; a un pH de 4,8: 1,2 cm hacia el cátodo.

10. El producto de partida se puede obtener como sigue

1. Bmp(TRI)-OH

Se disuelven 6,37 g de ácido β-mercaptopropiónico, recién destilados, en 100 cc de benceno y enjugando con nitrógeno se agregan en porciones, a 0°, 25,1 g de trifenilclorometano. Terminada la introducción se retira el enfriamiento con hielo. La solución, al principio clara, comienza a precipitarse el producto. Después de 2 horas se enfría a 0°, se filtra y se lava con metanol frío. La recristalización en cloruro metilénico-metanol suministra el producto claro del p.f. 200-201°.

20. 2. Bmp(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe

25. A una solución enfriada a 0° y agitada de 2,62 g de Bmp(TRI)-OH y 1,58 g de H-Gly-Asn-Leu-OMe en 30 cc de dimetilformamida se agregan 1,85 g de dicitclohexilcarbodiimida. Después de 24 horas a 0° se separa por filtración de la dicitclohexilúrea y el filtrado se evapora a 40° hasta sequedad. El producto se limpia disolviendo y precipitando



MAYO 1960

en metanol. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 45 = 0,67.

3. Bmp(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂

5. 1,06 g de Bmp(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe se mezclan en 30 cc de metanol con 3 cc de hidrato de hidrazina. Después de 2 horas a temperatura ambiente cristaliza el hidrazida al inyectar. Se recristaliza en metanol caliente. P.f. 190 - 194°. El Rf es : 0,35 en el sistema cloroformo-metanol (8:2).

10. 4. Bmp(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH

15. 926 mg de Bmp(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂ se mezclan en 8 cc de dimetilformamida a -15° con 2,21 cc de ácido clorhídrico 2,21-N en éster acético y 0,18 cc de t-butilnitrito. Después de 15 minutos a -10° se gotea una solución enfriada a -10° de 1,38 g de H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH y 0,7 cc de trimetilamina en 10 cc de dimetilformamida. Se agita aún durante una hora a -10° y se deja reposar durante 15 horas a 0°. Después de agregar 20 cc de metanol se separa por filtración, el precipitado se lava con metanol frío, después se frota en agua, se filtra y se seca sobre sosa cáustica. El producto unitario según el cromatograma de capa delgada se presenta en un 40 % como sal trietilamónica. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice el Rf = 0,55 en el sistema cloroformo-metanol (7:3).
- 20.
- 25.



5. Bmp-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH

5. A una solución de 1,4 g de Bmp(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH en 150 cc de dimetilformamida se agregan, a temperatura ambiente, 0,3 cc de ácido clorhídrico 1,0-N. La solución se gotea en el plazo de 30 minutos a una solución fuertemente agitada de 2,27 g de yodo en 500 cc de metanol. La mezcla se agita aún durante una hora a temperatura ambiente, después se enfría a 0° y agregando gota a gota solución acuosa 1,0-N de tiosulfato sódico de descolora. Después de agregar 1,6 cc de lejía sódica 0,5-N se concentra por evaporación a unos 20 cc con una temperatura del baño de 40°, se mezcla con unos 400 cc de éter y se decanta. El residuo se frota con 20 cc de agua, se filtra, se lava con agua fría y se seca sobre sosa cáustica. El producto se limpia disolviendo y precipitando de cloroformo-éter. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 121A = 0,43; Rf 100 = 0,34; Rf 43 = 0,28.

20. Bmp-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

25. 46 mg de Bmp-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH, 81 mg de H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂, 9,7 mg de N-hidroxisuccinimida y 13 mg de dicitclohexilcarbodiimida se men-

24 NOV 1954



5. tienen en 2 cc de dimetilformamida durante 3 1/2 horas a 45°. La solución clara se gotea entonces en 40 cc de éter absoluto a 0° y el producto precipitado se separa por filtración. Se limpia disolviendo y precipitando en metanol-agua. Rf 45 = 0,38 en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice.

Ejemplo 6

10. H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-OH

15. 120 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-OtBu se mantienen con 3 cc de ácido trifluoroacético al 95 % durante 1 1/2 horas bajo nitrógeno a temperatura ambiente, después se precipita con éter libre de peróxido. El producto separado por filtración se lava con éter hasta estar libre de ácido, después se disuelve en ácido acético 0,02-N, se filtra a través de una columna de intercambiador de iones Merck nº II (debilmente básico, forma de acetato) y el eluido se liofiliza. El dotriacontapéptido obtenido se traslada en la electrofóresis sobre "Selecta" con un pH de 1,9 y 280 V en 1 1/2 horas 3,0 cm hacia el cátodo, con un pH de 4,8: 1,5 cm. Rf 79 = 0,45; Rf 52 = 0,42; Rf 45 = 0,40, en "Alox" Rf 52 = 0,28; Rf 45 = 0,42; Rf 101A = 0,50 en "Selecta".
- 20.
- 25.



El producto de partida se puede obtener como sigue:

1. H-Pro-OtBu

5. 9,15 g de Z-Pro-OtBu se hidrogenan en 100 cc de metanol y 1,0 g de carbón de paladio (10 % Pd) a temperatura ambiente. La recepción del hidrógeno está terminada después de 30 minutos. La solución se separa por filtración del catalizador y se evapora a 30° en vacío a la trompa de agua. El aceite resultante es unitario en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice. Rf = 0,55 en el sistema cloroformo-metanol (1:1)
- 10.

2. Z-Ala-Pro-OtBu

15. 10,32 g de Z-Ala-ONP y 5,0 g de H-Pro-OtBu se dejan reposar a 0° en 10 cc de éster acético durante hora y a temperatura ambiente durante 15 horas. Después se diluye con 100 cc de éster acético, se lava con solución de carbonato potásico saturada en un 50 % y con agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora. El aceite resultante es unitario según el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice (Rf = 0,65 en el sistema cloroformo-metanol (9:1))
20. y se sigue empleando directamente.

3. H-Ala-Pro-OtBu

25. 9,36 g de Z-Ala-Pro-OtBu se hidrogenan en 100 cc de metanol en presencia de 500 mg de carbón de paladio (10 % de Pd) a temperatura ambiente. La recepción de hidrógeno ha terminado después de 90 minutos. La solución se separa por filtración del catalizador y se evapora a un aceite en



AGOSTO 1960

el vacío a la trompa de agua a 30°. Demuestra ser unitario en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice. Rf = 0,35 en el sistema cloroformo-metanol (1:1).

4. Z-Gly-Ala-Pro-OtBu

5. 1,65 g de Z-Gly-ONP y 1,09 g de H-Ala-Pro-OtBu se dejan reposar en 20 cc de éster acético durante una hora a 0° y durante 20 horas a temperatura ambiente. Después se diluye con éster acético, se lava con solución saturada al 50 % de carbonato potásico y con agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora. Se obtienen 2,06 g de un aceite unitario según el cromatograma de capa delgada. Rf = 0,8 en el sistema cloroformo-metanol (1:1) sobre gel de sílice.
- 10.

5. H-Gly-Ala-Pro-OtBu

15. 2,06 g de Z-Gly-Ala-Pro-OtBu se hidrogenan en 30 cc de metanol en presencia de 300 mg de carbón de paladio (al 10 %) a temperatura ambiente. La recepción de hidrógeno ha terminado después de 90 minutos. Se separa del catalizador por filtración y el filtrado se concentra por evaporación a unos 5 cc. Se agregan 10 cc de éster. Durante la noche cristaliza el producto. P.f. 132 - 134°; Rf = 0,3 en el sistema cloroformo-metanol (1:1) en gel de sílice.
- 20.

6. Z-Val-Gly-Ala-Pro-OtBu

25. 3,73 g de Z-Val-ONP y 2,99 g de H-Gly-Ala-Pro-OtBu se agitan en 12 cc de éster acético durante una hora a 0° y 20 horas a temperatura ambiente. Después de diluir con éster acético se lava con solución saturada al 50 % de



21 AGO. 1969

5. carbonato potásico y agua, se seca sobre sulfato de sodio y se evapora a 30° al vacío de la trompa de agua. El aceite se cristaliza en metanol-agua. P.f. 73-75°. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf=0,42 en el sistema tolueno-acetona (1:1) y el Rf = 0,46 en el sistema cloroformo-metanol (9:1).

7. H-Val-Gly-Ala-Pro-OtBu

10. 533 mg de Z-Val-Gly-Ala-Pro-OtBu se hidrogenan en 10 cc de metanol en presencia de 300 mg de carbón de paladio (al 10 %) a temperatura ambiente. Después de 20 minutos ha terminado la recepción de hidrógeno. Se separa del catalizador por filtración y el filtrado se evapora a 30° en vacío a la trompa de agua hasta obtener un aceite. Rf = 0,52 en el sistema cloroformo-metanol (1:1) sobre gel de sílice.

15. 8. H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

20. 270 mg de Z-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH se disuelven en 30 cc de ácido acético al 80 % y se hidrogena en presencia de 50 mg de carbón de paladio (10 %) hasta que haya terminado la disociación del grupo carbobenzoilo. Después de separar el catalizador por filtración se concentra fuertemente la solución en alto vacío a 30° y después se liofiliza en t-butanol. El rendimiento es cuantitativo.

25.



9. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH

5. 181 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH se disuelven en 1,8 cc de tetrahidrofurano libre de peróxido y a -40° hasta -15° se mezcla, conduciendo nitrógeno por encima, con 0,017 cc de N-metilmorfolina y 0,019 cc de cloroformiato de isobutilo. Después de 10 minutos a esta temperatura se agrega una solución de 255 mg del derivado de octadecapéptido obtenido bajo 8) en 5 cc de dimetilformamida al 95 % y 0,02 cc de N-metilmorfolina. Se agita aún durante 30 minutos a -10° y durante 2 horas a 0° . Mediante la adición de éter libre de peróxido se precipita el producto en bruto, éste se vuelve a disolver en dimetilformamida y se precipita goteando ácido clorhídrico 0,02-N enfriado con hielo. Disolviendo y precipitando dos veces en dimetilformamida-éster acético se obtiene un producto puro. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 52A = 0,43.
10. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-OtBu
15. 374 mg del derivado de péptido descrito bajo 9), 160 mg de H-Val-Gly-Ala-Pro-OtBu, 46 mg de hidroxisuccinimida y 3 cc de dimetilformamida se mezclan bajo nitrógeno
- 20.

10. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-OtBu

25. 374 mg del derivado de péptido descrito bajo 9), 160 mg de H-Val-Gly-Ala-Pro-OtBu, 46 mg de hidroxisuccinimida y 3 cc de dimetilformamida se mezclan bajo nitrógeno



- a temperatura ambiente con 62 mg de dicitohexilcarbodiimida y se deja reposar durante la noche a temperatura ambiente. Mezclando con éter se precipita el producto, se filtra y se lava también con éter y éster acético. El producto se disuelve nuevamente en dimetilformamida y se precipita gotteando ácido cítrico 0,05-m enfriado con hielo.
- 5.

Ejemplo 7

N^C-acetil-calcitonina M

- 100 mg de calcitonina M -acetato (ó -hidrocloruro) se disuelven en 5 cc de agua-dimetilformamida (2:1), se mezcla con 77 μ l de una solución al 10 % de p-nitrofenilacetato en dimetilformamida y mediante adición de solución acuosa 0,5-m de trietilamina se ajusta un pH de 9,1. Bajo este pH se inicia la reacción y se termina mediante adición continua de trietilamina manteniendo constante el pH en el transcurso de una hora aproximadamente. Se agregan entonces 150 μ l de ácido acético glacial y se extrae tres veces, cada una con 10 cc de éster acético. La fase acuosa se concentra por evaporación hasta sequedad y el residuo se limpia mediante una distribución según Craig en el sistema n-butanol-ácido acético glacial-agua (4:1:5) a través de 170 escalones. De los elementos de distribución 109 - 138 ($r_{max} = 122$; $K = 2,5$) se obtiene, al concentrar por evaporación hasta sequedad, la N^C-acetil-calcitonina M pura como polvo amorfo, soluble en agua.
- 15.
- 20.
- 25.

En el cromatograma de capa delgada sobre celulosa ("Selecta") es el R_f 101A = 0,67; en óxido de aluminio ("Allox



de la Fe. Comag) es el Rf 52 = 0,68.

En la electrofóresis sobre placas de cepsa delgada de celulosa ("Selecta") se traslada la sustancia a 17 Voltios/cm en 1½ horas con un pH de 1,9 2,6 cm hacia el cátodo, con un pH de 8,0 0,6 cm hacia el ánodo.

Ejemplo 8

Calcitonina M mono- y diacetilada

10. 10 mg de calcitonina M-acetato se disuelven en 2 cc de dimetilformamida absoluta, se mezcla con 0,5 cc de una solución al 1 % de p-nitrofenilacetato en dimetilformamida, se enjuaga con nitrógeno y el tubo de cristal cerrado se deja reposar durante 30 minutos a 40°. Se agregan entonces 5 cc de ácido acético 2-N, se extrae el p-nitrofenilacetato en exceso y el p-nitrofenol formado con éster acético (2 x 30 cc), la fase acuosa se evapora en vacío hasta sequedad, se vuelve a disolver el 0,5 cc de ácido acético al 95 % y se liofiliza. El producto se compone de una mezcla de derivado mono- y diacetílico, además de algo de producto de partida. El derivado monoacético es, a su vez, una mezcla de N^α - y N^ε -derivado como se demuestra en la electrofóresis a un pH de 8.

25. La separación del material de partida, del mono- y diacetilo se efectúa según la distribución de Craig en el sistema n-butanol-ácido acético glacial-agua (4:1:5), o en una electrofóresis de cepsa delgada preparativa sobre placas de celulosa ("Selecta") con un pH de 1,9 (1½ horas a 17 Voltios/cm); recorrido: véase más abajo. La mezcla de los dos

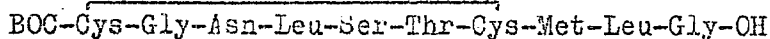


- derivados monoacéticos, obtenida de esta manera, se separa también mediante electroforesis de capa delgada preparativa con un pH de 8 (tampon: solución 0,1-m de trietilamina ajustada con dióxido de carbono a un pH de 8; 3 horas a 17 Voltios/cm). Para mayores cantidades de sustancia se emplea la electroforesis continua, libre de soporte, asimismo a un pH de 8. En ambos se comporta neutro la N^{α} -acetil-calcitonina M, electricamente, mientras el derivado N^{ϵ} -acético se traslada hacia el ánodo.
10. Los compuestos muestran los siguientes valores Rf: N^{α} -acetil-calcitonina M sobre celulosa "Selecta": Rf 101A = 0,67; sobre óxido de aluminio ("Alox" de la Fa. Camag) Rf 52 = 0,68. La N^{ϵ} -acetil-calcitonina tiene en ambos sistemas los mismos valores Rf como la N^{α} -acetil-calcitonina M (la calcitonina M muestra en estos sistemas Rf 101A = 0,56 y Rf 52 = 0,62); la N^{α}, N^{ϵ} -diacetil-calcitonina M muestra en estos dos sistemas Rf 101A = 0,75 y Rf 52 = 0,73. En la electroforesis sobre placas de capa delgada de celulosa ("Selecta") es el recorrido de N^{α} - y de N^{ϵ} -monoacetil-calcitonina M = -2,6 cm a un pH de 1,9; 90 minutos; 17 Voltios/cm; y la de N^{α}, N^{ϵ} -diacetil-calcitonina M, bajo iguales condiciones, -1,3 cm (la de calcitonina M -3,7 cm). Con un pH de 8,0 se traslada la N^{ϵ} -acetil-calcitonina M en 90 minutos a 17 Voltios/cm +0,6 cm, mientras la N^{α} -acetilcalcitonina M (al igual que la calcitonina M) se queda parada en el punto de partida.
- 15.
- 20.
- 25.



Ejemplo 9

El producto de partida:



descrito en el ejemplo 1 se puede obtener también de la manera siguiente:

5.

1. BOC-Ser-Thr-OBzl

10.

A una solución de 73,8 g de BOC-Ser-OH, sal diciticlohexilamónica, en 500 cc de cloruro metilénico se agregan 47,0 g de H-Thr-OBzl, HCl en 300 cc de cloruro metilénico, se agita durante 10 minutos a temperatura ambiente y se enfría entonces a -5° . A esta temperatura se gotea una

15.

solución de 40,1 g de diciticlohexilcarbodiimida en 90 cc de cloruro metilénico. Se agita durante 3 horas a -5° y durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de separar por filtración la diciticlohexilúrea y el hidrocloreuro de la diciticlohexilamina se agita la solución, y esto tres veces con ácido clorhídrico 0,1-N, dos veces con solución al 20 % de sal común, una vez con solución al 10 % de bicarbonato sódico y dos veces con solución al 20 % de sal común y se

20.

seca sobre sulfato sódico. La solución se concentra por evaporación a unos 600 cc, se enfría a 5° y se separa por filtración de la ulterior diciticlohexilúrea. Después de evaporar hasta sequedad se cristaliza el residuo, para su limpieza, en éster acético-hexano.

25.

P.f. 110-111 $^{\circ}$; $[\alpha]_D = -8,5$ (c = 2 en dimetilformamida);
Rf 2 = 0,33 (en gel de sílice).



2. H-Ser-Thr-OBzl, TFA

65,7 g de BOC-Ser-Thr-OBzl se disuelven en 100 cc de ácido trifluoroacético al 90 % y la solución se deja durante 1 hora a 20°. Después se gotea, bajo agitación, en 1000 cc de éter seco, se agita durante una hora y se deja reposar durante la noche a -10°. El precipitado obtenido se separa por filtración y se lava tres veces con éter seco y se seca en vacío sobre sosa cáustica; P.f. 128-129°; Rf 7 = 0,65; Rf 4 = 0,50 (en gel de sílice).

3. BOC-Leu-Ser-Thr-OBzl

52,5 g de H-Ser-Thr-OBzl, TFA se disuelven en 145 cc de dimetilformamida y a 0° se mezcla con una solución de 48,0 g de BOC-Leu-ONP. Se agregan entonces 21 cc de trietilamina y 0,75 cc de ácido acético glacial. La mezcla de reacción se agita durante 3 horas a 0° y durante la noche a temperatura ambiente. Después de agregar 2,1 litros de éster acético se agita la solución y esto dos veces con agua, dos veces con ácido clorhídrico 0,1-N, dos veces con solución al 10 % de sal común, ocho veces con solución al 20 % de carbonato potásico, dos veces con solución de sal común al 10 % y una vez al 30 %. Después de secar sobre sulfato sódico se concentra la solución por evaporación a aproximadamente 1,4 litros. Durante la noche en la nevera cristaliza el tripéptido protegido del p.f. 114-116°; $[\alpha]_D = -14^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida); Rf 2 = 0,25 (en gel de sílice).



AGD. 1969

4. H-Leu-Ser-Thr-OBzl, TFA

46,1 g de BOC-Leu-Ser-Thr-OBzl se disuelven en 92,5 cc de ácido trifluoroacético al 90 % y se deja durante 1 hora a 20°. Después se agrega, bajo agitación, éter seco (925 cc), se agita durante una hora a 0° y se deja reposar durante la noche a -10°. El precipitado formado se separa por filtración, se lava tres veces con éter seco y se seca en vacío sobre sosa cáustica. P.f. 168-171°; Rf 7 = 0,80 (en gel de sílice).

10. 5. BOC-Asn-Leu-Ser-Thr-OBzl.

20,8 g de BOC-Asn-OH se suspenden en 208 cc de acetonitrilo, se mezcla con 22,7 g de reactivo K de Woodward y se agita durante 30 minutos a 20°. Después se gotean bajo agitación 12,6 cc de trietilamina de manera que la temperatura interior no sobrepase los +32°, se enfría a 20° y a esta temperatura se agita aún durante 50 minutos. La solución casi clara se enfría a 0° y se mezcla con una solución, asimismo enfriada a 0°, de 39,1 g de H-Leu-Ser-Thr-OBzl, TFA y 10,5 cc de trietilamina en 257 cc de dimetilformamida.

15. La mezcla de reacción que solidifica rápidamente se agita durante la noche a temperatura ambiente, se enfría a -10° y se agita aún durante 2 horas a -10°. Después se filtra en vacío el precipitado cristalino y el derivado tetrapéptido se lava una vez con acetonitrilo frío, una vez con éster acético y tres veces con agua, hasta estar libre de cloruro.

20. El producto obtenido se cristaliza en 370 cc de dimetilformamida, 3,7 cc de ácido acético glacial y 370 cc de aceto-



nitrilo. P.f. 225-226^o; $[\alpha]_D = -36^o$ (c = 2 en dimetilformamida); Rf 6 = 0,85 (en gel de sílice).

6. H-Asn-Leu-Ser-Thr-OBzl, TFA

5. 32 g de BOC-Asn-Leu-Ser-Thr-OBzl se disuelven en 192 cc de ácido trifluoroacético al 90 % y se deja durante 45 minutos a 20^o. Después se concentra la solución por evaporación a unos 40 cc, se mezcla bajo agitación con 400 cc de éter y se agita durante 20 minutos bajo reflujo a 35^o.
10. La suspensión cristalina se enfría entonces a -10^o y se deja reposar durante la noche a -10^o. El precipitado se separa por filtración, se lava tres veces con éter y se seca en vacío sobre sosa cáustica. P.f. 125-127^o; Rf 4 = 0,33 (en gel de sílice).

7. BOC-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-OBzl

15. 26,3 g de H-Asn-Leu-Ser-Thr-OBzl, TFA se disuelven en 100 cc de dimetilformamida, se enfría a 0^o, se mezcla consecutivamente con 7,5 cc de trietilamina, 0,54 cc de ácido acético glacial y una solución de 14,4 g de BOC-Gly-ONP en 100 cc de dimetilformamida, se agita a temperatura ambiente hasta que la mezcla solidifique y se deja reposar durante 2 días. Se agregan entonces, bajo agitación 300 cc de éster acético y se deja reposar durante la noche a -10^o.
20. El precipitado se separa por filtración, se lava dos veces con éster acético y dos veces con éter, se agita durante media hora con 200 cc de agua, se separa por filtración, se lava con agua y se seca en vacío. P.f. 227-228^o;
25. $[\alpha]_D = -23^o$ (c = 2 en dimetilformamida); Rf 9 = 0,50 (en gel de sílice).



8. BOC-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-OH

5. 17,0 g de BOC-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-OBzl se disuelven bajo calentamiento en 340 cc de dimetilformamida. Después de enfriar a temperatura ambiente se agregan 3,4 g de carbón de paladio al 10 % y se hidrogena. La reducción ha terminado después de 4 horas. Después de separar el catalizador por filtración se concentra la solución por evaporación en alto vacío. Frotando tres veces con éter se obtiene un pentapéptido unitario según el cromatograma de capa delgada. P.f. 181-183°; $[\alpha]_D^{20} = -16,5^{\circ}$ (c = 2 en dimetilformamida); Rf 7 = 0,65 (en gel de sílice).
- 10.

9. BOC-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-N₂H₂-Z

15. 9,2 g de H-Cys(Bzl)-N₂H₂-Z.HCl se disuelven en 300 cc de dimetilformamida recién destilada, se mezcla con 12,2 g de BOC-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-OH y a temperatura ambiente se agita hasta disolver. Entonces se enfría la solución a 0°, se agregan 3,28 cc de trietilamina y 4,88 g de N-hidroxisuccinimida en 100 cc de dimetilformamida, se sigue enfriando a -22° y se agregan 4,36 g de dicitclohexilcarbodiimida en 30 cc de dimetilformamida. Se agita durante una hora a -22°, se deja entonces subir lentamente la temperatura interior, se agita aún durante 3 días a temperatura ambiente, se filtra de la dicitclohexilúrea precipitada y se evapora en alto vacío hasta sequedad. El residuo se
20. agita con una mezcla de éster acético y solución al 5 % de ácido cítrico, el precipitado se separa por filtración, se lava con agua, se seca en vacío, se agita con éter seco, se
- 25.



filtre y se seca en alto vacío. P.f. 173-178° $[\alpha]_D = -25,5^{\circ}$
(c = 2 en dimetilformamida); Rf 1 = 0,21 (en gel de sílice).

10. H-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-N₂H₂-Z, TFA

5. 13 g de BOC-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-N₂H₂-Z se disuelven en 130 cc de ácido trifluoroacético al 90% y la solución se deja reposar durante 2 horas a 22°. Después se concentra la solución por evaporación y el residuo se agita tres veces con éter y se seca en vacío sobre sosa cáustica. P.f. 159-161°. Rf 6 = 0,63 (en gel de sílice).

10. 11. BOC-Cys(Bzl)-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-N₂H₂-Z

15. 6,69 g de BOC-Cys(Bzl)-OSU y 12,2 g de H-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-N₂H₂-Z, 1,22 TFA se disuelven en 100 cc de dimetilformamida. De una solución de 150 mMol de trietilamina en 100 cc de dimetilformamida se gotes bajo agitación tanta trietilamina hasta que la mezcla de reacción sobre papel indicador húmedo indique un pH de 6,4. La solución se agita durante 3 días a temperatura ambiente, después se evapora en alto vacío hasta sequedad. El residuo se agita dos veces con 300 cc de éster acético, a continuación tres veces con una mezcla de 150 cc de éster acético y 30 cc de solución al 5 % de ácido cítrico, se separa por filtración, se seca en vacío y se cristaliza en dimetilformamida-éster acético. P.f. 191-193°; $[\alpha]_D = -31,5^{\circ}$
20. (c = 2 en dimetilformamida); Rf 8 = 0,35 (en gel de sílice).



AGOSTO 1960

12. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-N₂H₃

5. 6 g de BOC-Cys(Bzl)-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-N₂H₂-Z se disuelven a -40° en 700 cc de amoníaco líquido seco. Bajo agitación se agregan en el punto de ebullición del amoníaco 973 mg de sodio de manera que el color de la mezcla de reacción se vuelve solamente azul claro. Después de 25 minutos ha terminado la reducción. Se agita aun durante 10 minutos manteniendo el tñido azul, se agregan entonces 2,4 cc de ácido acético glacial y se evapora en alto vacío (aprox. 1 mm) hasta sequedad. El residuo se agita con 12 cc de agua, 3,2 cc de ácido acético glacial y 20 cc de éster acético durante una hora a 0°, el precipitado se separa por filtración, se lava dos veces con solución de ácido acético al 1% (10 cc) y una vez con 10 cc de éster acético y se seca en alto vacío.
- 10.
15. Rf 5 = 0,65 (en gel de sílice).

13. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-N₂H₃

20. 1,0 g de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-N₂H₃ se disuelve en 100 cc de dimetilformamida y 500 cc de agua, que contiene 1,23 m-equivalentes de ácido clorhídrico. Con 3,7 cc de una solución 0,43-N de hidróxido potásico se ajusta el valor pH de la solución a 6,8. Manteniendo este valor pH se gotean en el plazo 90 minutos, bajo agitación, simultáneamente 247 cc de una solución 0,01-m de ferriclenuro potásico y 4,9 cc de una solución 0,43-N de hidróxido potásico. Se agita aún a temperatura ambiente durante 90 minu-
- 25.



- tos y a continuación se ajusta con 0,7 cc de ácido acético glacial el valor pH de la solución a 4,0. Después se agita la solución con 50 cc de Dowex-2-X8, forma de acetato, a continuación con 13 cc de Dowex-50W-X8, forma H⁺, se filtra y se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en t-butanol al 50 %, se liofiliza y se seca en alto vacío. El producto contiene aproximadamente un 15 % de acetato potásico. Es unitario en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice. Rf 5 = 0,63; Rf 6 = 0,70; Rf 7 = 0,75.
- 5.
10. 14. H-Leu-Gly-OEt, HCl
Se disuelven 14 g de Z-Leu-Gly-OEt [preparada según J.R. Vaughan & R.L. Osato, J. Am. Chem. Soc. 73, 5553 (1951)] en 150 cc de etanol absoluto, se mezcla con 11,5 cc de una solución 6,9-N de ácido clorhídrico en etanol y se hidrogena en presencia de 2,8 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Después de 1 hora se separa del catalizador por filtración en vacío y en vacío, a 40° de temperatura del baño, se evapora. El residuo es un aceite y se sigue elaborando directamente. Rf 1 = 0,50 (en gel de sílice).
- 15.
20. 15. BOC-Met-Leu-Gly-OEt
10,5 g de BOC-Met-N₂H₃ en 100 cc de dimetilformamida se mezclan a 0° con 14,8 cc de ácido clorhídrico en tetrahidrofurano (5,39-N, 80 mMol), a continuación a -20° con 5,4 cc de iso-amilnitrito. Después de 5 minutos a -20° se agrega una solución previamente enfriada de 10,1 g de H-Leu-Gly-OEt, HCl y 16,9 cc de trietilemina en 100 cc de dimetilformamida. La mezcla de reacción se deja durante 3
- 25.



- dias a 0°. Después se separa por filtración del hidrocioruro de trietilamina precipitado y el filtrado se evapora en alto vacío hasta sequedad. El residuo se disuelve en acetato de etilo y la solución se lava consecutivamente con 3 porciones de solución diluida de ácido cítrico, 3 porciones de solución diluida de bicarbonato sódico y con agua. El producto en bruto que se obtiene después de secar y evaporar la solución se cristaliza en éster acético-hexano.
5. P.f. 118-119°; $[\alpha]_D = -30^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida);
Rf 1 = 0,72 (en gel de sílice).
- 10.

16. BOC-Met-Leu-Gly-OH

- 9,98 g de BOC-Met-Leu-Gly-OEt se disuelven en 300 cc de metanol. En el plazo de 45 minutos se gotean, a temperatura ambiente, 57 cc de lejía sódica 0,59-N y se agita aún durante 1 hora. Después se ajusta con ácido clorhídrico 0,68-N el pH a 7 y la solución se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en éster acético y agua y el pH se ajusta con ácido clorhídrico 0,68-N a 2. La fase acuosa se agita con éster acético. Las fases éster acéticas reunidas se lavan con solución de sal común, se seca y se evapora. El residuo se cristaliza en éster acético-hexano.
15. P.f. 137 - 138°; $[\alpha]_D = -31^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida);
Rf 7 = 0,74 (en gel de sílice).
- 20.

17. H-Met-Leu-Gly-OH

25. 6,9 g de BOC-Met-Leu-Gly-OH se disuelven en 70 cc de ácido trifluoroacético al 90 % y se deja reposar durante 1 hora a 20°. Después se concentra la solución por evaporación.



- ción, bajo agitación se mezcla con 150 cc de éter y se deja reposar durante la noche a -10° . El precipitado formado se separa por filtración y de nuevo se agita con 100 cc de éter, se separa por filtración, se lava dos veces con éter y se seca en vacío sobre sosa cáustica.
5. P.f. 134 - 135⁰; Rf 7 = 0,52 (en gel de sílice).
18. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-OH
800 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-N₂H₃
(contiene un 15 % de acetato potásico) se suspenden en 15 cc de dimetilformamida y se agita durante 15 minutos a 45° ; una parte de la suspensión se disuelve. Se enfría ahora a 0° y primeramente se agregan 1,45 cc de ácido clorhídrico en tetrahidrofurano (2,0-N), se sigue enfriando a -20° y entonces se agregan 0,114 cc de iso-amilnitrito. Después de 10 minutos a -20° se mezcla con 0,24 cc de trietilamina y a continuación se agrega una solución previamente enriada de 431 mg de H-Met-Leu-Gly-OH, 0,57 TFA en 5 cc de dimetilformamida. De una solución diluida de trietilamina en dimetilformamida se gotea tanta trietilamina hasta que la mezcla de reacción sobre papel indicador húmedo señale un pH de 6. La solución turbia se deja durante 3 días a 0° , después se separa por filtración del precipitado formado. El filtrado se evapora en alto vacío hasta sequedad; el residuo se agita tres veces con solución al 10 % de ácido cítrico, el producto obtenido se separa por filtración y se seca en alto vacío.
10. 15. 20. 25.
- Rf 6 = 0,68; Rf 7 = 0,75 (en gel de sílice).



Ejemplo 10

N^{α} -palmitoil-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (N^{α} -palmitoil-calcitonina M)

5.

171 mg de N^{α} -palmitoil-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se mezclan con 5

10.

cc de ácido clorhídrico concentrado, de análisis puro, enfriado con hielo, se agita a 0° hasta la solución (unos 2 minutos) y la solución se deja a continuación bajo nitrógeno durante otros 8 minutos a 0°. Después se libera del ácido clorhídrico disuelto en forma gaseosa mediante evecus-

15.

ción durante 1 minuto a 0,01 Torr, se agregan entonces 100 cc de t-butanol y se liofiliza. Se obtienen así 138 de la sal clorhídrica de la N^{α} -palmitoil-calcitonina M como polvo incoloro. En el cromatograma de capa delgada sobre óxido de aluminio ("Alox") muestra el producto el Rf 45 = 0,52; Rf 52 = 0,76. El producto muestra en el ensayo según Kumar en comparación con la calcitonina M un efecto claramente más prolongado.

20.

La N^{α} -palmitoil-dotriacontapéptido-amida protegida, empleada como producto de partida, se puede preparar de la manera siguiente:

25.

1. Palmitinato de p-nitrofenilo (Pal-ONP = hexadecanato de p-nitrofenilo):



5. A 5,0 g de p-nitrofenol en 60 cc de cloroformo-éter (1:1) se agregan, bajo enfriamiento con hielo, primeramente 9,4 g de cloruro palmítico y después 5,0 cc de trietilamina. Después de hervir durante 2 horas bajo reflujo se recoge en éster acético y la fase orgánica se lava con potasa 0,5-N y agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora. Cristalizando con éter-éter de petróleo se obtienen hojitas del p.f. 64-65°.

2. Pal-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe

10. 1,32 g de H-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe y 780 mg de palmitinato de p-nitrofenilo se disuelven en 20 cc de dimetilformamida recién destilada y se deja reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. Del producto en bruto resultante después de evaporar el disolvente se obtiene por disolución y precipitación en metanol el compuesto en forma pura según el cromatograma de capa delgada.

15.

3. Pal-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂

20. A 1,35 g de Pal-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe en 40 cc de metanol se agregan 4,0 cc de hidrato de hidrazina y la solución se mantiene durante 24 horas a temperatura ambiente. En el evaporador de rotación se concentra entonces a 25° a unos 20 cc y se agregan 150 cc de ácido acético 0,5-N. El producto precipitado se separa por filtración, se lava con agua fría y se seca sobre sosa cáustica. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice muestra el producto el Rf 100 = 0,45.

25.



21 AGO. 1969

4. P_ol-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH

5. 1,08 g de P_ol-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂ en 10 cc de dimetilformamida se mezclan a -15° con 1,5 cc de ácido clorhídrico 2,0-N en éster acético y 0,17 cc de t-butilnitrito. Después de 15 minutos a -10° se gotea una solución enfriada a -10° de 980 mg de H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-met-Leu-Gly-OH y 0,56 cc de trietilamina en 10 cc de dimetilformamida. Después de reposar durante una hora a -10° y durante 1 1/2 horas a 0° se agregan 30 cc de metanol y el producto precipitado se separa por filtración, se lava con metanol frío y a 40° se seca en alto vacío. El polvo resultante se frota tres veces, cada una con 10 cc de agua y después se seca sobre sosa cáustica. Disolviendo y precipitando en dimetilformamida-metanol se obtiene el producto puro según el cromatograma de capa delgada.

10.

15.

5. P_ol-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH

20. Una solución de 670 mg de P_ol-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH en 50 cc de dimetilformamida se gotea a temperatura ambiente, en el plazo de 20 minutos a una solución fuertemente agitada de 1,0 g de yodo en 150 cc de metanol. Se agita aún durante una hora y después se descolorea la solución de reacción a 0° mediante adición a 0°, gota a gota, de tiosulfato sódico acuoso 1-N. La solución clara se concentra por evaporación, primeramente en vacío a la trompa de agua, después a 30°

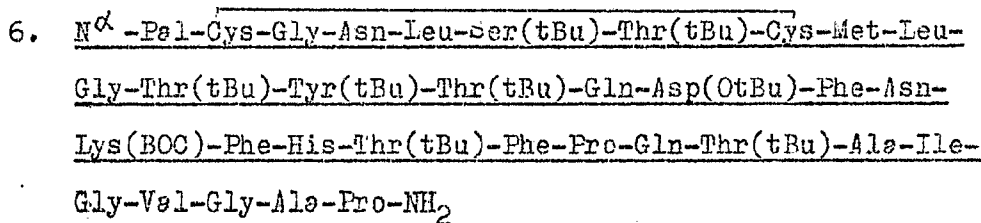
25.

21 AGO. 1961



hasta unos 10 cc, se mezcla con 200 cc de éter-éter de petróleo (1:1) y se decanta. El residuo se frota, después de secar brevemente, en vacío a la trompa de agua, tres veces cada una con 10 cc de agua y se seca sobre sosa cáustica.

5. Para su limpieza se disuelve y precipita de cloroformo-éter de petróleo. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el Rf 53 = 0,50.



10.

A una solución de 418 mg de N^α-P_{al}-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH, 290 mg del docosa-
péptido protegido descrito en el ejemplo 2 sub.44 y 110 mg de N-hidroxisuccinimida en 15 cc de dimetilformamida recién
destilada se agregan bajo agitación y calentando a 45°
135 mg de dicitclohexilcarbodiimida. Se agita aún durante
3 horas bajo nitrógeno a 45°, se agregan nuevamente cada
vez 70 mg de N-hidroxisuccinimida y dicitclohexilcarbodiimida

15.

y se agita durante otras 4,5 horas a 45°. Después se enfría a 0° y se vierte en 300 cc de éter libre de peróxido, enfriado con hielo. Después de 12 horas a 0° se filtra en vacío el precipitado, se le lava con éter y se seca en vacío a 40°

20.

Para su limpieza se disuelve el producto en metanol-cloroformo (1:1) y en este disolvente se cromatografía ascendiendo en una columna de "Sephadex" LH 20 de las dimensiones 110 x 4,2 cm. Se recogen fracciones de 3 cc y se com-

25.



prueban mediante cromatografía de capa delgada. En esta cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice es el Rf 52A = 0,62.

5. Ejemplo 11

N^α-lauril-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (N^α-lauril-calcitonina M)

- 7 mg de N^α-lauril-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se agregan, bajo agitación, a 0,42 cc de ácido clorhídrico concentrado, de análisis puro, enfriado con hielo y, bajo nitrógeno, se agita durante 10 minutos a 0°. Para retirar el ácido clorhídrico disuelto en forma de gas se mantiene durante 1 minuto a 0° y 0,01 Torr, después se agregan 6 cc de t-butanol y la mezcla se liofiliza. Se obtienen 5 mg del monohidrocloruro de la N^α-lauril-calcitonina M.
- 10.
- 15.

20. En la disposición de ensayo indicada por Kumar et al. (J. Endocrinology, 33, 469 /1965/) muestra el producto un efecto mas prolongado en comparación con la calcitonina.

El producto de partida se puede preparar como sigue:

25. 1. Laurinato de p-nitrofenilo (Leu-ONP = dodecanato de p-nitrofenilo)



60 1989

El compuesto se prepara según el mismo procedimiento como descrito para el palmitinato de p-nitrofenilo de 5,0 g de p-nitrofenol y 7,2 g de cloruro leucílico.

2. Leu-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OMe

5. 1,5 g de leucinato de p-nitrofenilo y 1,65 g de H-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OME se dejan reposar en 25 cc de dimetilformamida durante 24 horas a temperatura ambiente. La evaporación del disolvente y la disolución y precipitación en metanol suministra el producto unitario según el cromatograma de capa delgada. Rf 53 = 0,60 en gel de sílice.
- 10.

3. Leu-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂

15. 1,0 g de Leu-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-OME se hacen reaccionar en 40 cc de metanol y 4 cc de hidrato de hidrazina durante 24 horas a temperatura ambiente. El aislamiento se efectúa concentrando por evaporación la solución y precipitando con ácido clorhídrico 0,5-N. Rf 100 = 0,40 en gel de sílice.

20. 4. Leu-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH

25. 1,42 g de Leu-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂, disueltos en 10 cc de dimetilformamida, se mezclan a -15° con 1,38 cc de ácido clorhídrico 2-N en éster acético y 0,14 cc de t-butilnitrito. Después de dejar reposar durante 15 minutos a -10° se agrega la solución enfriada a -10° de 965 mg de H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH y



- 0,525 cc de trietilamina en 10 cc de dimetilformamida y se deja reposar durante 1 hora a -10° y durante 15 horas a 0° . El producto precipitado de la solución de reacción en forma de gelatina se precipita totalmente mediante adición
5. de 20 cc de metanol, se filtra y se frota tres veces, cada una con 10 cc de agua y se seca sobre sosa cáustica. Para la limpieza se disuelve y precipita en metanol caliente.
5. Leu-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH
10. A una solución agitada de 1,0 g de yodo en 150 cc de metanol se gotean a temperatura ambiente 700 mg de Leu-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH en 50 cc de dimetilformamida, en el plazo de 20 minutos, y después se sigue agitando aún durante una hora.
15. Para eliminar el agente de oxidación en exceso se agrega a 0° , gota a gota, solución 1-N de tiosulfato y después se concentra en vacío a la trompa de agua y en alto vacío a unos 10 cc. Mediante adición de 200 cc de éter-éter de petróleo (1:1) se precipita, el precipitado secado se frota tres veces con agua, se seca sobre sosa cáustica y para la limpieza se disuelve y precipita de cloroformo-éter de petróleo.
20. 6. N^α-lauryl-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂
- 25.



- Una mezcla de 35 mg del docosapéptido amida protegido, descrito en el ejemplo 2 sub. 44, 24 mg de N^{α} -lauril-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH, 6 mg de N-hidroxisuccinimida y 0,8 cc de dimetilformamida
5. se agita durante 1 hora bajo nitrógeno a 50° , se agregan entonces 6 mg de dicitlohexilcarbodiimida, se agita durante otras 2 horas bajo nitrógeno a 50° , se vuelven a agregar cada vez 3 mg de N-hidroxisuccinimida y dicitlohexilcarbodiimida y se agita aún durante 8 horas a 50° bajo nitrógeno.
10. Después se vierte toda la mezcla en 60 cc de éter libre de peróxido, se deja reposar durante 18 horas a 0° , el precipitado fino se separa por filtración y se seca en vacío a 40° . Se obtienen 30 mg del N^{α} -lauril-dotriacontapéptido-amida protegido, en bruto. Para su limpieza se disuelve el producto en bruto en metanol-cloroformo (1:1) y se cromatografía en forma ascendente a través de una columna preparada en la misma mezcla (1,5 x 30 cm) de Sephadex LH 20. Se recogen fracciones de 3 cc, se evaporan individualmente y se determina su pureza mediante cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice. (R_f 52A = 0,55).
15. Se obtienen 15 mg de dotriacontapéptido-amida protegida, pura.
- 20.

Ejemplo 12

25. H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (Calcitonine M)

32 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys



Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se liberan en la misma forma como descrito en el ejemplo 2 de los grupos protectores.

- 5. El acetato de la concitonina M obtenido se comporta en la cromatografía de capa delgada y en la electrofóresis igual como el producto descrito en el ejemplo 2. En la cromatografía de capa delgada sobre óxido de aluminio "Alox" (Cemag) es el Rf 52 = 0,48; Rf 45 = 0,41; Rf 79 = 0,55.
- 10. En la cromatografía de capa delgada sobre celulosa (Selecta, placas preparadas S+S nº 1440) es el Rf 101A = 0,54; Rf 45 = 0,40.
En la electrofóresis sobre celulosa (Selecta - placas preparadas nº 1440) es el recorrido de traslación hacia el cátodo a 280 V en 1,5 horas con un pH de 9,10 = 4,0, con un pH de 4,85 = 4,2.

La dotriacontapéptido-amida protegida, empleada como producto de partida, se puede obtener como sigue:

- 20. 1. BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

- 25. 125,6 mg de BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Met-Leu-Gly-OH y 189,0 mg de H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se suspenden junto con 31,4 mg de N-hidroxisuccinimida



5. en 2,5 cc de N,N-dimetilformamida bajo nitrógeno. Se agregan 37 mg de dicitclohexilcarbodiimida en 1 cc de dimetilformamida y se agita durante 4,5 horas a 45°. Después se vierte el preparado en 250 cc de éter absoluto agitado, se separa el precipitado coposo por filtración y se le lava con éter. Se obtienen 314 mg del producto de difícil solubilidad en metanol.

10. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el Rf 100 = 0,51; Rf 107 = 0,77; Rf 52A = 0,56; Rf 43E = 0,65.

15. 2. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(tBu)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

20. 219 mg del dotriacontapéptido-amida protegido, descrito bajo 1 se disuelven en dimetilformamida caliente y después de enfriar a temperatura ambiente se gotea en el plazo de 30 minutos a una solución de 124 mg de yodo resublimado en 30 cc de metanol. Después de enjuagar dos veces, cada una con 2,5 cc de dimetilformamida se agita aún durante 1 hora a temperatura ambiente y después se gotea lentamente, a 0°, 1,25 cc de solución acuosa 1-N de tiosulfato sódico hasta que la solución esté casi incolora. A continuación se agregan 0,05 cc de lejía sódica acuosa 2-N y en vacío se concentra por evaporación a aproximadamente 1/3 de su volumen. La solución se introduce y agita en 450 cc de éter libre de peróxido y el precipitado se filtra. Este re-

25,

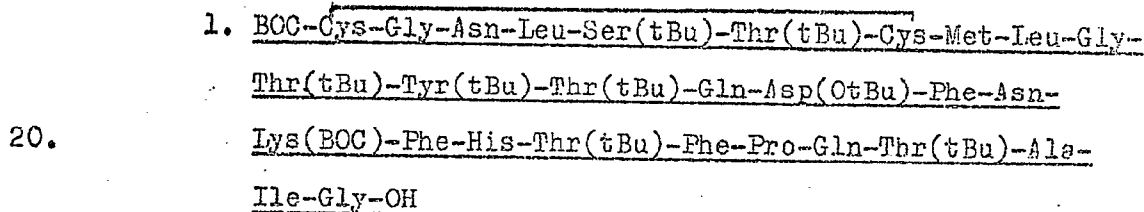


siduo de filtración se somete directamente a una distribución de contra-corriente en el sistema metanol/tampón/cloroformo/tetraclorocarbano 11:3:6:7 (tampón como en el ejemplo 1 bajo 18). Después de 280 escalones se encuentra la sustancia en los recipientes 100 hasta 132. Esta se aisla y en el mismo sistema se vuelve a distribuir en 560 escalones. El producto localizado mediante cromatografía de capa delgada se aisla (K = 0,69) y en alto vacío se libera a 40° del acetato amónico.

10. En el cromatograma de capa delgada es el Rf 52A = 0,4; Rf 100 = 0,35; Rf 87 = 0,66; Rf 43E = 0,59.

Ejemplo 13

15. La calcitonina M protegida, empleada en el ejemplo 2 como producto de partida, se puede sintetizar de los fragmentos 1.- 28 + 29 - 32 como sigue:



25. 860 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-OH en 7 cc de dimetilformamida se mezclan con 0,1 cc de trietilamina y 292 mg de tricloroacetato de pentaclorofenilo, a 0°, y se agita a esta temperatura, bajo nitrógeno, durante una hora. Se agregan ahora 1,627 g de H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)

21-AGO 1961

- Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH
(preparado de 1,75 g del compuesto carbobenzoxi descrito en el ejemplo 1, bajo 49, mediante hidrogenación en ácido acético al 80 %), 0,09 cc de trietilemina y 7 cc de dimetilformamida y se agita durante la noche a temperatura ambiente. El producto en bruto que se precipita después de gasearlo en ácido clorhídrico 0,02-N frío como el hielo, se limpia mediante distribución en contra-corriente en el sistema metanol-tempón-cloroformo-tetraclorocarbono (11:3:6:7, tempón como en el ejemplo 1 bajo 18). Coeficiente de distribución H = 0,8. Las fracciones que contienen el derivado octacosapéptido se reúnen, la solución se concentra fuertemente y se liofiliza en t-butanol. El producto puro muestra en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice el Rf 45 = 0,33; Rf 100 = 0,35 y Rf 115 = 0,48.
5. 10. 15.
2. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp-OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂
20. 25.
- 50 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH y 27 mg de H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ (Ejemplo 2 bajo 42) se disuelven en 1 cc de dimetilformamida. A la solución se agregan 2,9 mg de N-hidroxisuccinimida y 8,3 mg de dicitclohexilcarbodiimida y la solución se agita durante 2 horas ba-



- jo nitrógeno. Después se agregan otros 1,7 mg de N-hidroxisuccinimide y 5,5 mg de dicitclohexilcarbodiimide (ambos disueltos , cada vez, en 0,1 cc de dimetilformamide) y se agita durante otras 3 horas a 45°. Después se vierte la solución clara en 50 cc de éter, el precipitado se separa por filtración en vacío, se seca, se frota con agua, se filtra en vacío y el polvo aún húmedo se disuelve y precipita en metanol. De esta manera se separa el derivado tetrapéptido en exceso aún existente en el producto en bruto. La calcitonina M protegida obtenida muestra los valores Rf indicados en el ejemplo 2 bajo 45.
5. 10.

La disociación de los grupos protectores se efectua como descrito en el ejemplo 2. La calcitonina M libre obtenida contiene huellas del derivado sulfóxido, por lo demás es pura. La actividad biológica del producto asciende a 80 U/mg.

15.

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 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 los números y fechas siguientes: 12691/68 de 23 de agosto de 1968, - 12811/68 de 27 de agosto de 1968, - 13067/68 de 30 de agosto de 1968, - 15147/68 de 10 de octubre de 1968, - 17235/68 de 19 de noviembre de 1968, y 11671/69 de 31 de julio de 1969, accigiéndose por lo tanto, a los beneficios que conceden los
20. 25. 30.



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 péptidos de eficacia hipocalcémica; caracterizándose por lo siguiente:

5.

1.- Procedimiento para la obtención de péptidos de eficacia hipocalcémica, caracterizado porque un dotria contapéptido de fórmula I:

10.

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-OH (I)

15.

ó los compuestos correspondientes, en los cuales uno o varios restos de asparagina y glutamina están sustituidos por el resto del ácido asparagínico, ó bien el resto del ácido glutamínico y/o el resto del ácido asparagínico por el resto asparagina, sus dímeros, y los derivados de los péptidos monómeros ó dímeros, así como las sales de adición de ácido y los complejos de los péptidos monómeros y dímeros y sus derivados, se preparan según métodos en sí conocidos.

20.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque (1), en los compuestos de fórmula I, ó los mencionados análogos, ó derivados, ó dímeros de estos compuestos, en cuyos compuestos como mínimo un grupo amino, ó un grupo carboxilo está protegido por un grupo protector dissociable, el grupo (ó los grupos) protector(es) se disocia(n) ó (2), los compuestos de fórmula II:

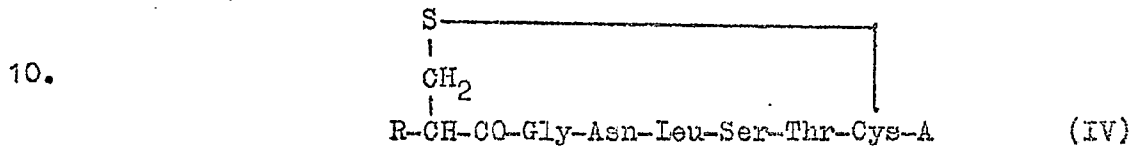
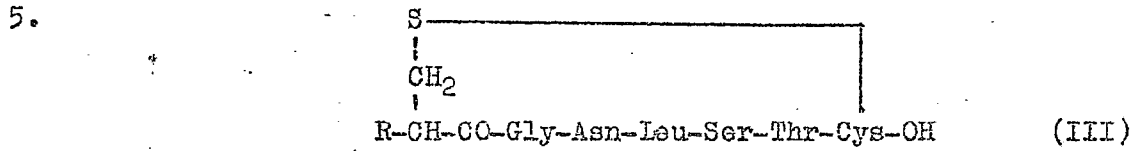
25.

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-OH (II)

30.



ó los mencionados análogos o derivados, donde los grupos mercapto están libres ó protegidos por el grupo tritilo, se oxidan a disulfuros, ó (3), los compuestos de fórmulas III ó IV:



15. en las que A significa 1 hasta 21 de los restos aminoácidos que siguen a la cisteina⁷ con grupo amino de cadena lateral, en caso dado protegido, y R significa hidrógeno ó un radical amino acilado, se condensan con la restante secuencia C-terminal del péptido con grupo amino de cadena lateral, en caso dado protegido, hasta el amino ácido C-terminal (L-prolina) según los métodos conocidos en las síntesis de los péptidos, bajo condición de que se emplea un método que parte de un grupo ácido carboxílico activado, tal como el método azida, el método anhídrido ó el método de los ésteres activados cuando la secuencia C-terminal muestra un grupo carboxilo libre y, si se desea, los compuestos libres obtenidos se transforman en sus derivados y/o sales de adición de ácidos ó complejos.

20. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, para la obtención de nuevos péptidos según uno de los procedimientos destacados en la descripción.

25. 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 3, caracterizado porque se parte de compuestos

30.



en los cuales los grupos carboxilo están protegidos por el grupo terc.butiléster.

5. 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 4, caracterizado porque se parte de compuestos en los que los grupos amino están protegidos por el grupo terc.butiloxycarbonilo.

10. 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 5, caracterizado porque se parte de compuestos en los que los grupos hidroxilo en las cadenas laterales están protegidos por el grupo terc.butiléter.

7.- Procedimiento para la obtención de nuevos péptidos como indicado en las representaciones esquemáticas ó descrito en los ejemplos.

15. 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado porque se prepara el amida C-terminal del compuesto de fórmula I ó las sales de adición de ácido de aplicación terapéutica ó los complejos del mismo.

20. 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado porque se prepara la Asp¹⁵, Pro³²-diamida del compuesto de fórmula I ó las sales de adición de ácido de aplicación terapéutica ó los complejos del mismo.

25. 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1- 7, caracterizado porque se preparan los derivados N-acílicos del amida C-terminal del compuesto de fórmula I ó las sales de adición de ácido de aplicación terapéutica ó los complejos de estos compuestos.



5. 11.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado porque se prepara el derivado N-acetilico de la amida C-terminal del compuesto de fórmula I ó las sales de adición de ácido de aplicación terapéutica ó los complejos de estos compuestos.

10. 12.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 7, caracterizado porque se prepara el derivado desamino de la amida C-terminal del compuesto de fórmula I ó las sales de adición de ácido de aplicación terapéutica ó los complejos del mismo.

15. 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 12, caracterizado porque el dotriacontapéptido ó dotriacontapéptido-amida protegido, empleado como producto de partida, se prepara por condensación del decapéptido N-terminal protegido con el docosapéptido ó docosapéptido-amida C-terminal protegido.

20. 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 - 12, caracterizado porque el dotriacontapéptido ó dotriacontapéptido-amida protegido, empleado como producto de partida se prepara por condensación del octacosapéptido N-terminal protegido con el tetrapéptido ó tetrapéptido-amida C-terminal.

25. 15.- Procedimiento para la obtención de péptidos de eficacia hipocalcémica; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.

Esta memoria consta de ciento cincuenta y dos hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

CIBA SOCIETE ANONYME.

J. GÓMEZ ACEBO Y MÓDEJ
p. p. Firmado A. GARCIA BRAVO

21 AGO 1960