

3724

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE C07 A61
SUBCLAS: C B

PATENTE DE INVENCION

Case 6577/1-3

372445

13 OCT



Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PEPTIDOS DE EFICACIA
HIPOCALCEMICA.

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

El objeto de la invención son nuevos péptidos de eficacia
hipocalcémica de fórmula I

1 | 2 3 4 5 6 7 | 8 9 10 11 12 13 14 15 16
H-Cys-Gly-Asn-Iso-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Arg-Phe-
17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro

5. NH₂,

donde como mínimo uno y como máximo 16 de los aminoácidos en las
posiciones 2, 3, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 21, 23, 24, 25, 26,



- 27, 28, 30 y 31 están sustituidos por otros α -aminoácidos naturales o sus homólogos, especialmente por los aminoácidos existentes en las correspondientes posiciones de la tirocalcitonina porcina, sus dímeros, especialmente aquellos en los cuales 2 secuencias de péptido iguales (1-32 y 1'-32') están enlazados en disposición anti-paralela a través de los restos cisteínicos 1,7' y 7,1' mediante enlace disulfúrico, y los derivados de los péptidos monómeros ó dímeros, así como las sales de adición de ácido y los complejos de los mencionados péptidos mono- y dímeros y sus derivados, y a un procedimiento para la obtención de éstos compuestos.
- 5.
10. Son de destacar especialmente los péptidos de fórmula I, donde el aminoácido en la posición 8, la metionina, está sustituido por valina, norvalina, leucina, isoleucina, norleucina ó ácido α -amino-butírico, así como aquellos que contienen glicina en la posición 12 y/ó 18, sus dímeros, derivados, sales de adición de ácido y complejos.
15. Los derivados de los compuestos mencionados son, ante todo, aquellos en los cuales el grupo α -amino está acilado, así como los correspondientes desamino¹-péptidos.
- Los grupos acílicos para la acilización de los grupos amino, especialmente para la acilización del grupo N^o-amino, son los
20. restos de ácidos carboxílicos, tales como los ácidos carboxílicos alifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos y heterociclic-alifáticos, especialmente de ácidos alcánicos ó alquénicos inferiores, mono- ó bivalentes, tales como el ácido fórmico, acético, propiónico, los ácidos butíricos, el ácido acrílico, el ácido succínico, de ácidos carboxílicos alicíclicos, tales como los ácidos cicloalquilcarboxílicos, de ácidos carboxílicos monocíclicos aromáticos, mono- ó bivalentes, tales como el ácido benzéico ó ftálico, sin sustituir y sustituido, de ácidos aril-alquilo inferior- ó -alquenil-carboxílicos sin sustituir ó aril-sustituidos, tales
- 25.

372445³

13



- como el ácido fenilacético, de ácidos heterocíclicos de 5 hasta 6 miembros, mono- ó bivalentes, sin sustituir ó sustituidos, con nitrógeno, azufre y/ó oxígeno como heterocétomos, tales como los ácidos piridincarboxílicos, tiofencarboxílicos, ó de ácidos heterociclicil-alcano inferior, tales como el ácido piridilacético, ácido imidazolilacético, donde los sustituyentes de los anillos son, por ejemplo, átomos de halógeno, grupos nitro, grupos alquilo inferior ó alcoxi inferior ó grupos carbaloxi inferior. Además son de mencionar como restos acilo, ante todo, los restos acilo de aminoácidos, especialmente de α -aminoácidos tales, por ejemplo, el resto pirroglutamílico, además los restos acílicos que se derivan del ácido carbónico ó del ácido tiocarbónico, ó bien sus ésteres ó amidas, por ejemplo, los grupos alquiloxi inferior-carbonilo, tales como etoxicarbonilo, terc.-butiloxicarbonilo, además el benciloxicarbonilo sin sustituir, ó sustituido como arriba indicado, carbamoilo y tiocarbamoilo, así como el carbamoilo y tiocarbamoilo N-sustituido, por ejemplo, N-alquilo inferior-carbamoilo, N-fenilcarbamoilo, N-fenil-tiocarbamoilo.

- Como sales de adición de ácido son de mencionar especialmente las sales de los ácidos de aplicación terapéutica, tales como el ácido clorhídrico, el ácido acético, el ácido sulfúrico, el ácido fosfórico y los ácidos sulfónicos, tales como los ácidos alcano inferior-sulfónicos, el ácido benceno- ó toluenosulfónico.

- Bajo complejos se han de entender los compuestos cuya estructura aún están sin aclarar, que bajo adición de ciertas sustancias orgánicas ó inorgánicas forman péptidos de cadena larga imprimiendo a éstos un efecto prolongado. Tales sustancias se describen, por ejemplo, para ACTH y otros péptidos de eficacia adrenocortico-

372445

1300



- cotrópica. Son de mencionar, por ejemplo, los compuestos inorgánicos que se derivan de metales, tales como del calcio, magnesio, aluminio, cobalto y especialmente del cinc, ante todo las sales de difícil solubilidad, tales como los fosfatos, pirofosfatos, y polifosfatos así como los hidróxidos de éstos metales, además los polifosfatos de metal alcalino, tales como, por ejemplo "Calgon N", "Calgon 322", "Calgon 188" ó "Poliron B 12". Sustancias orgánicas que producen una prolongación del efecto son, por ejemplo, las gelatinas no antígenas, por ejemplo, la polioxigelatina, el polivinilpirrolidón y la celulosa carboximetilica, además los ésteres del ácido sulfónico ó del ácido fosfórico del ácido algínico, dextrano, polifenoles y polialcoholes, ante todo el polifloretilfosfato y el ácido fitínico así como los polímeros y copolímeros de los aminoácidos, por ejemplo, la protamina ó el ácido poliglutamínico.
- 5.
- 10.
15. Los nuevos compuestos, especialmente aquellos que en la posición 8 contienen uno de los aminoácidos de intercambio arriba mencionados, muestran un efecto hipocalcémico. Estos reducen el contenido de plasma, calcio y fosfato en la sangre de los mamíferos, tal y como se ha podido demostrar mediante ensayos en ratas Wistar.
15. Los compuestos reducen también en el ser humano en nivel de plasma-calcio de la sangre en administración intravenosa de 0,01 hasta 5 mg en tampón de acetato 0,1-m del pH 4,6 y, por lo tanto, se pueden emplear en forma correspondiente para la hipercalcemia.
20. El procedimiento según la presente invención para la obtención de los nuevos péptidos mono- ó dímeros, sus derivados, sus sales de adición de ácido y complejos se caracteriza porque
1. en los compuestos de fórmula I

372445



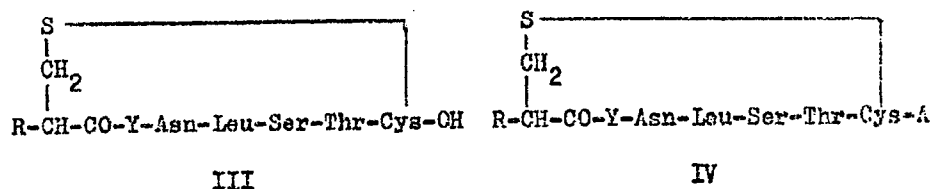
103 OCT. 1969

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
 H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-
 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
 Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-
 NH₂,

5. donde como mínimo uno y como máximo 16 de los aminoácidos en las posiciones 2, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 y 31 están sustituidos por otros α-aminoácidos naturales ó sus homólogos, ó en los dímeros correspondientes ó derivados de éstos péptidos, en cuyos compuestos como mínimo un grupo amino ó un grupo carboxilo está protegido por un grupo protector disociable, se disocia el grupo protector (ó los grupos protectores) ó
10. 2. los compuestos de fórmula II

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
 H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-
 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
 Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-
 NH₂ II,

15. donde como mínimo uno y como máximo 16 de los aminoácidos en las posiciones 2, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 y 31 están sustituidos por otros α-aminoácidos naturales ó sus homólogos, ó los mencionados derivados, donde los grupos mercapto están libres ó protegidos por el grupo tritilo, se oxidan a disulfuros ó
20. 3. Los compuestos de fórmula III ó IV



25. donde Y significa glicilo ó L-serilo, A representa 1 hasta 21 de los restos aminoácido subsiguientes a Cisteína⁷, en caso dado



- intercambiados en la forma indicada, con grupo amino de cadena lateral en caso dado protegido y R significa hidrógeno ó un grupo amino acilado, se condensa con la restante secuencia C-terminal del péptido con grupo amino de cadena lateral, en caso dado protegido (hasta el término C de la L-prolinamida), según los métodos conocidos en la síntesis de los péptidos y, si se desea, los compuestos monómeros obtenidos se transforman en sus dímeros ó los péptidos mono- ó dímeros libres se transforman en sus derivados y/ó sales de adición de ácido ó complejos.
- 5.
10. Para la preparación de los productos de partida para la primera variante del procedimiento según la presente invención, como también de todos los productos intermedios necesarios en las 3 variantes del procedimiento, entran en consideración, como grupos protectores, especialmente los conocidos por la síntesis de péptidos de cadena larga, así como algunos nuevos grupos protectores que se pueden disociar fácilmente, por ejemplo, por hidrólisis, reducción, aminólisis ó hidrazinólisis.
- 15.
20. Así se emplean, por ejemplo, como grupos protectores para los grupos amino, los grupos acilo ó aralquilo, tales como los grupos formilo, trifluoracetilo, ftaloilo, bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo, o-nitrofenilsulfenilo, 2,4-dinitrofenilsulfenilo (éstos grupos sulfenilo se pueden disociar también por reacción de reactivos nucleófilos, por ejemplo, sulfitos, tiosulfatos, véase patente inglesa 1 104 271), en caso dado sustituidos, tal como,
25. por ejemplo, por grupos alcoxi inferior, especialmente los grupos difenil- ó trifenilmetilo sustituidos por grupos o- ó p-metoxi, ó grupos que se derivan del ácido carbónico, tales como grupos arilmetiloxicarbonilo sustituido en los anillos aromáticos, por ejemplo, por átomos de halógeno, tales como cloro ó bromo, gru-

372-5



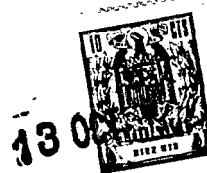
5. pes nitro, grupos alquilo inferior ó alcoxi inferior ó grupos eterales, por ejemplo, grupos azo, en los cuales el grupo metileno puede estar sustituido por un resto arilo ulterior y/ó uno ó, en caso dado, dos restos alquilo inferior, tales como grupos bencilo, benzhidrilo ó 2-fenil-isopropil-oxicarbonilo, por ejemplo, carbobenzoxi, p-bromo- ó p-clorocarbobenzoxi, p-nitrocarbobenzoxi ó p-metoxicarbobenzoxi, p-fenilazo-benziloxicarbonilo y p-(p-metoxi-fenilazo)-benciloxicarbonilo, 2-tolilisopropiloxicarbonilo y, especialmente 2-(p-bifenilil)-isopropiloxicarbonilo (vease la patente francesa Nr. 1 554 051), así como grupos oxicarbonilo alifáticos tales como adamantiloxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, tricloroetiloxicarbonilo, terc.-amiloxicarbonilo ó, ante todo, terc.-butiloxicarbonilo.
- 10.

15. Los grupos amino se pueden proteger también mediante formación de enaminas, obtenidas por reacción del grupo amino, con 1,3-dicetonas, por ejemplo, benzilacetona, acetilacetona ó dimedona.

20. Los grupos carboxilo se protegen, por ejemplo, por formación de amida ó hidrazida ó por esterificación. Los grupos amida e hidrazida pueden, en caso dado, estar sustituidos, el grupo amida, por ejemplo, por el grupo 3,4-dimetoxibencil- ó bis-(p-metoxifenil)-metilo, el grupo hidrazida, por ejemplo, por el grupo carbobenzoxi, el grupo tricloroetiloxicarbonilo, el grupo trifluoracetilo, el grupo tritilo, el grupo terc.-butiloxicarbonilo ó al grupo 2-(p-bifenilil)-isopropiloxicarbonilo. Para la esterificación son adecuados, por ejemplo, los alcoholes inferiores, en caso dado sustituidos, tales como metanol, etanol, cianetilalcohol, benzil-
- 25.

372445

- 8 -



- metilalcohol ó, especialmente el terc.-butanol, además los aralcanoles tales como los arilalcanoles inferiores, por ejemplo, los alcoholes bencílicos ó bencilhidrídicos, en caso dado sustituidos por grupos alquilo inferior ó alcoxi inferior ó átomos de halógeno, tales como el alcohol p-nitrobencílico, el alcohol p-metoxibencílico ó el alcohol 2,4,6-trimetilbencílico, los fenoles y tiofenoles en caso dado sustituidos por sustituyentes atraedores de electrones, tales como tiofenol, tiocresol, p-nitrotiofenol, 2,4,5- y 2,4,6-triclorofenol, pentaclorofenol, p-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, p-cianofenol ó p-metansulfonilfenol, además, por ejemplo, la N-hidroxisuccinimida, N-hidroxi-ftalimida, N-hidroxi-piperidina, 8-hidroxi-quinolina.

- Los grupos hidroxí de los restos serina, treonina y tirosina se pueden proteger, por ejemplo, por esterificación ó eterización. Como restos acilo en la esterificación son adecuados, por ejemplo, los restos alcanilo inferior, tales como acetilo, los restos arilo, tales como benzoilo y, ante todo, los restos que se derivan del ácido carbónico, tal como el benciloxicarbonilo ó etiloxicarbonilo. Grupos adecuados para la eterización son, por ejemplo, los restos bencilo, tetrahidropirranilo ó terc.-butilo. Además son adecuados para la protección de los grupos hidroxilo los grupos 2,2,2-trifluor-1-terc.-butiloxicarbonilamino- ó -1-benciloxicarbonilaminoetilo (Woygand), descritos en Ber. 100 (1967), 3838 - 3849. Los grupos hidroxilo no necesitan sin embargo ser forzosamente protegidos.

Los grupos mercapto de los restos cisteina se protegen, por ejemplo, por acilización ó alquilización. Para la acilización

372445

- 9 -



- es adecuado, por ejemplo, el resto acetilo ó benzoilo, el resto etilcarbamilo ó el resto carbobenzoxi, en caso dado sustituido. Para la alquilización son adecuados, por ejemplo, el resto terc.-butil- ó benciltiometilo ó los grupos arilmetilo en caso dado sustituidos, tales como bencilo, p-nitrobencilo, difenilmetilo, dimetoxibenzhidrilo ó tritilo, además el fenilciclohexilo, tienil(2)-ciclohexilo y otros, vease Ber. 101 (1969), 681. El grupo imino de la histidina no necesita ser forzosamente protegido, pero puede ser ventajoso protegerle, por ejemplo, por bencilo, tritilo, carbobenzoxi, adamantiloxicarbonilo ó los grupos de Weygand arriba mencionados.
- 5.
- 10.

- Preferentemente se emplea en la primera variante el procedimiento de la presente invención, para la protección del grupo carboxilo de la cadena lateral, el grupo terc.-butiléster, para la protección de un grupo amino de la cadena lateral el grupo terc.-butiloxicarbonilo, para los grupos hidroxilo de los restos serina, treonina y tirosina, siempre que éstos hayan de ser protegidos, el grupo terc.-butiléster, si se desea, para la protección del grupo imino de la histidina, el grupo 2,2,2-trifluor-1-terc.-butiloxicarbonilaminoetilo. Todos éstos grupos protectores se pueden dissociar, si se desea, en una sola etapa mediante hidrólisis ácida, por ejemplo, mediante ácido trifluoracético ó ácido clorhídrico. Durante la síntesis de los dotriacontapéptidos protegidos, empleados en la primera variante del procedimiento como productos de partida, bajo empleo de grupos protectores dissociables con ácido trifluoracético ó ácido clorhídrico, se protegen los grupos mercapto, preferentemente, con bencilo ó tritilo. Los grupos S-tritilo se
- 15.
- 20.
- 25.

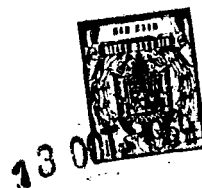


5. pueden disociar del péptido protegido en disolvente orgánico en forma selectiva (manteniendo los grupos disociables con ácido trifluoracético) con mercuriacetato y sulfhidrógeno. Los grupos S-bencílicos se pueden disociar selectivamente del péptido protegido con sodio en amoniaco líquido. En ambos casos se obtiene el péptido protegido con grupos mercapto libres. Este se puede oxidar entonces al disulfuro protegido, por ejemplo, con yodo en ácido acético glacial, con diyodostano en disolventes orgánicos ó con oxígeno del aire en amoniaco líquido. Es especialmente ventajoso proteger los
10. grupos mercapto mediante grupos tritilo y retirar éstos del péptido protegido bajo formación simultanea del puente disulfúrico con yodo en metanol, vease Kamber y Rittel, Helv. Chim. Acta 51 (1968) 2061. La formación del anillo disulfúrico se puede realizar en la etapa de una de las secuencias parciales conteniendo los dos restos cisteina, por ejemplo, del decapeptido 1-10 ó en la etapa del dotriacontapéptido.
- 15.

20. En la 2ª variante del procedimiento de la presente invención se puede obtener el péptido de cadena abierta, empleado como producto de partida, preferentemente asimismo con los grupos protectores mencionados para la variante 1). Los grupos S-tritilo se pueden retirar con ácido trifluoracético y el péptido de cadena abierta libre oxidar, en forma conocida, con ferricianuro potásico en solución acuosa ó con yodo ó con aire en amoniaco líquido. Pero también se pueden retirar los grupos tritilo según el procedimiento arriba
25. mencionado con yodo y metanol, bajo formación simultánea del disulfuro.

Para la obtención de los derivados N-acílicos se puede

372445¹¹ -



emplear el grupo acilo como grupo protector amino.

5. Los péptidos monómeros obtenidos se pueden transformar ulteriormente, en forma en sí conocida, en sus dímeros y a la inversa, y/ó los péptidos mono- ó dímeros en sus derivados, sales de adición de ácido y/ó complejos. Las transformaciones ulteriores se pueden realizar en una secuencia conveniente, individualmente ó en combinación.

10. La transformación de los compuestos monómeros obtenidos en los dímeros se efectua, por ejemplo, mediante tratamiento con compuestos mercapto en medio neutro ó debilmente ácido, por ejemplo, mediante tratamiento con hidrocioruro de cisteina. Los compuestos dímeros se pueden transformar bajo condiciones básicas, por ejemplo, con amoniaco diluido, en los compuestos monómeros.

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

20. La formación de las sales de adición de ácido se efectua en forma conocida.

También la formación de complejos se realiza según métodos conocidos ó equivalentes a éstos.

25. Los complejos con productos inorgánicos tales como compuestos de metal de difícil solubilidad, por ejemplo, compuestos de aluminio ó de cinc, se preparan convenientemente en forma análoga a como conocido para el ACTH, por ejemplo, por reacción con

372445



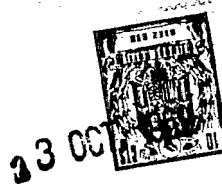
13 001

- una sal soluble del metal correspondiente, por ejemplo, cloruro de cinc ó sulfato de cinc, y precipitación con un fosfato y/ó hidróxido de metal alcalino. Los complejos con compuestos orgánicos tales como polioxigelatina, celulosa carboximética, polivinilpirrolidón, polifloretilfosfato, ácido poliglutámico, etc. se obtienen mediante mezcla de éstas sustancias con el péptido en solución acuosa. En igual forma se pueden preparar también compuestos insolubles con polifosfatos de metal alcalino.
- 5.
10. La invención se refiere también a aquellas formas de ejecución del procedimiento en las cuales se parte de un producto intermedio que se obtiene en cualquier etapa del procedimiento y se realizan las etapas que faltan, ó el procedimiento se interrumpe en cualquier etapa y/ó un producto de partida se forma in situ y/ó se emplea en forma de una sal.
15. Los péptidos empleados como productos de partida se obtienen si los aminoácidos, si es necesario ó deseable empleando grupos protectores fácilmente dissociables, se enlazan en la secuencia mencionada, individualmente ó después de haber formado unidades de péptidos más pequeñas, formándose aquí en caso dado en una etapa adecuada la síntesis del puente disulfuro. Convenientemente se trabaja según los métodos adecuados para la obtención de péptidos de cadena larga, teniendo en consideración el puente disulfuro, tal y como se conoce por la literatura.
20. El enlace de las unidades aminoácido y/ó péptido se efectúa por lo tanto, por ejemplo, haciendo reaccionar un aminoácido ó un péptido con grupo α -amino protegido y grupo carboxilo terminal activado con un aminoácido ó un péptido con grupo α -amino
- 25.



- libre y grupo carboxilo terminal libre ó protegido, por ejemplo, esterificado ó amidado, ó reaccionando un aminoácido ó un péptido, con grupo α -amino activado y grupo carboxilo terminal protegido, con un aminoácido ó un péptido, con grupo carboxilo terminal libre y grupo α -amino protegido. El grupo carboxilo se puede activar, por ejemplo, mediante transformación en un azida, anhídrido, imidazolido de ácido ó en un éster activado, tal como éster cianmetílico, éster tiofenílico, éster p-nitrotiofenílico, éster tiocerasílico, éster p-metansulfonilfenílico, éster p-nitrofenílico, éster 2,4-dinitrofenílico, éster 2,4,5- ó 2,4,6-triclorofenílico, éster pentaclorofenílico, éster N-hidroxisuccinimídico, éster N-hidroxitfalimídico, éster 8-hidroxiquinolínico, éster N-hidroxipiperidínico, ó por reacción mediante un carbodiimida (en caso dado, bajo adición de N-hidroxisuccinimida) ó N,N'-carbonildiimidazol, ó sal isoxazolínica, por ejemplo, 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 de Merrifield y el método de los anhídridos N-carboxi ó anhídridos N-tiocarboxi.

Además de la obtención de los productos finales representa también la preparación de los productos de partida, ante todo de la fracción de péptido, que contiene el puente disulfuro, y su enlace con la parte restante del péptido, un objeto especial de la invención. Cuando el aminoácido en la posición 10 ó 12 es glicina, es ventajoso partir de una secuencia que comprende los primeros



10 ó bien 12 aminoácido N-terminales y condensar con éste término N toda la secuencia restante.

5. Pero también se puede enlazar toda la secuencia N-terminal mencionada con el fragmento hasta el 28 aminoácido (glicina) con grupo carboxilo C-terminal libre y condensar el octacosapéptido con el amida tetrapéptido de los aminoácidos 29-32. Esta condensación se efectúa, por ejemplo, según el método de Weygand-Wünsch. En caso de que se realice la condensación de la secuencia 1-10, ó bien 1-12, con la secuencia C-terminal 11-32 ó bien 13-32 se emplea preferentemente el método carbodimida ó el método según
10. Weygand-Wünsch.

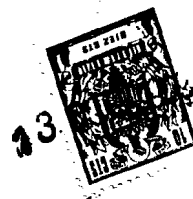
15. A continuación se explican formas de ejecución preferentes para la preparación del péptido de fórmula I, en el cual el octavo aminoácido, la metionina, está sustituida por valina, norvalina, leucina, isoleucina, norleucina ó ácido α -aminobutírico (éste octavo aminoácido se denomina en las figuras como X). Los esquemas muestran modos de trabajo especiales que, naturalmente, se pueden sustituir por modos de trabajo equivalentes.

En las figuras y en los ejemplos significan:

20. 1) el método azida
 2) el método de los anhídridos mixtos
 3) el método de los ésteres activados, especialmente el éster p-nitrofenílico (ONP) ó el éster hidroxisuccinimida (OSU)
 4) el método carbodimida
25. 5) el método según Weygand-Wünsch
- BOC terc.-butiloxicarbonilo
 DPC 2-(p-bifenilil)-isopropiloxicarbonilo
 Z carbobenzoxi

372445

- 15 -



- TRI tritilo
- Bzl bencilo
- OtBu éster terc.-butílico
- OBzl éster bencilico
5. ONB éster p-nitrobencilico
- ONP éster p-nitrofenilico
- OMe éster metílico
- OEt éster etílico
- OCP éster 2,4,5-triclorofenilico
10. tBu terc.-butiléter
- Ac acetilo
- TFA ácido trifluoracético
- Abu ácido α -aminobutírico

15. El decapeptido N-terminal (1-10) con X con el significado indicado como octavo aminoácido 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 sin embargo también se pueden emplear otras fracciones para la sintetización de la secuencia 1-10. Como grupo protector para el grupo α -amino en la cisteína¹
20. se emplea preferentemente el grupo terc.-butiloxicarbonilo ó un grupo equivalente, dissociable por hidrólisis ácida, ó, cuando se haya de preparar un dotriacontapéptido N α -acilado, el correspondiente grupo acilo, por ejemplo, el grupo acetilo. Además se emplean convenientemente, como grupos protectores mercapto, aquellos que se
25. pueden dissociar selectivamente con relación al grupo protector N α -amino (por ejemplo, el grupo terc.-butiloxicarbonilo) dissociable por hidrólisis ácida, por ejemplo, el grupo bencilo ó tritilo.



- El grupo carboxilo terminal del decapeptido no necesita ser forzosamente protegido, por ejemplo, no cuando las condensaciones se efectuan según el método azida ó anhídrido. Este grupo se puede proteger, sin embargo, también mediante esterificación, como arriba
5. indicado, por ejemplo, por esterificación con metanol ó etanol (disociación del grupo éster con lejía sódica diluida) ó con alcohol bencílico ó análogos (disociación del grupo éster, por ejemplo, con sodio en amoniaco líquido). La protección de los grupos amino de los productos intermedios se efectua mediante los grupos protectores usuales, por ejemplo, carbobenzoxi, tritilo, terc.-butiloxi-carbonilo ó 2-para-difenil-isopropiloxicarbonilo. Los grupos carboxilo de los productos intermedios se esterifican, si es necesario, en la forma usual. Los grupos hidroxil de los restos serina y treonina se pueden proteger por eterización, por ejemplo, con terc.-butanol ó equivalentes.
- 10.
15. Los grupos éster p-nitrobencílico y éster bencílico se pueden disociar con sodio en amoniaco líquido ó por hidrogenólisis en presencia de carbón de paladio, el grupo carbobenzoxi asimismo por hidrogenólisis, el grupo N-tritílico con ácido acético acuoso,
20. el grupo terc.-butiloxicarbonilo con ácido trifluoroacético, el grupo 2-(p-bifenilil)-isopropiloxicarbonilo con ácido acético acuoso ó, por ejemplo, con una mezcla de ácido acético glacial, ácido fórmico (al 82,8 %) y agua (7:1:2) como descrito en la patente francesa Nr. 1 554 051. El éster p-nitrobencílico ó metílico
25. se puede transformar con hidrato de hidrazina en la hidrazida. Con lejía sódica diluida se hidroliza el grupo éster metílico ó éster etílico. El éster terc.-butílico se disocia con ácido tri-



5. fluoracético, asimismo el terc.-butiléter. Los grupos S-tritilo se retiran con mercuriacetato e hidrógeno sulfurado, el grupo S-bencílico con sodio en amoniaco líquido, disociándose simultáneamente los grupos éster bencílico ó éster p-nitrobencílico en caso dado existentes. El cierre de anillo al disulfuro se efectúa, por ejemplo, por oxidación con 1,2-diyodoetano, aquél de los compuestos protegidos con S-tritilo con yodo en metanol.

10. La secuencia N-terminal, a enlazar con la secuencia C-terminal, comprendiendo los 11 hasta 32 ó bien 11 hasta 28 aminoácidos se compone, por ejemplo, de las secuencias 11-16, 17-20, 21-28 y 28-32, tal y como se muestra en la figura 9.

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

La figura 10 muestra la constitución del hexapéptido (en forma de la hidrazida) de los aminoácidos 11-16. 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 tetrapéptido de los aminoácidos 17-20, la figura 12 la constitución del octapéptido 21-28. Después de enlazar las dos secuencias se disocia el grupo protector α -amino (el grupo carbobenzoxi por hidrogenólisis en presencia de carbón de paladio) y el dodecapéptido con cadenas laterales protegidas, así obtenido, se condensa según el método azida con el hidrazida hexapéptido 11-16 (figura 10).



La secuencia 11-28, así obtenida, se puede enlazar con el amida tetrapéptido de los aminoácidos 29-32, cuya preparación muestra la figura 13, por ejemplo, según el método de Weygand-Wünsch. Se obtiene entonces el amida docosapéptido protegido 11-32.

5. De éste se puede dissociar el grupo protector α -amino (carboben-zoxi, por ejemplo, hidrogenolíticamente) DPC con ácido acético al 90 % ó ácido acético glacial-ácido fórmico (al 82,8 %) - agua (7:1:2) y el compuesto así obtenido con grupo α -amino libre, después de retirar el ácido acético, enlazar con el decapéptido N-terminal (figura 1-8), por ejemplo, según el método de los anhídridos mixtos, de los ésteres activados (OSU) ó según Weygand-Wünsch.

15. Pero también se puede enlazar la secuencia 11-28 con grupo carboxilo C-terminal libre, después de dissociar el grupo protector α -amino en la forma mencionada, con el decapéptido N-terminal según el método de los anhídridos mixtos y, el producto así obtenido, condensar con el amida tetrapéptido 29-32, por ejemplo, según Weygand-Wünsch. Otra posibilidad de sintetizar la secuencia C-terminal 11-32 consiste, por ejemplo, en componerla de las secuencias parciales 11-19 y 20-32, que se indican en las figuras 14 y 15, preferentemente según el método de los anhídridos mixtos ó según Weygand-Wünsch.

20. Del amida dotriacontapéptido protegido se disocian los grupos protectores, por ejemplo, con ácido trifluoracético, ó con ácido clorhídrico concentrado.

25. El dotriacontapéptido con grupo SH-libres ó bien protegidos con tritilo, a emplear para el procedimiento según la variante 2), se puede preparar en forma análoga como el dotriacontapéptido pro-

372445

- 19 -



130

5. tegido arriba descrito, con la diferencia de que los grupos SH protegidos se mantienen hasta el final de la síntesis. Solo después de haber retirado todos los demás grupos protectores del dotriacontapéptido protegido se disocian los grupos protectores SH, ó bien se oxida directamente el compuesto protegido con tritilo como arriba mencionado.

10. La síntesis según la variante 3) del procedimiento es especialmente adecuada para la obtención de productos finales con grupos aminos acilados ó, ante todo, también para la preparación de péptidos α -desamino ó α -acilados en los cuales el aminoácido 18, la lisina, está intercambiada por un aminoácido que no contiene ningún grupo amino acilable en la cadena lateral, por ejemplo, por glicina ó por el aminoácido 18 de la tirocalcitonina porcina, la asparagina. El decapeptido N^{α} -acilado se puede obtener, por 15. ejemplo, según la figura 5 K; como grupo protector amino se puede seleccionar sin embargo también el grupo acilo a mantener desde un principio. Los métodos de síntesis corresponden a los arriba descritos.

20. Según el modo de trabajo se obtienen los nuevos compuestos en forma de bases ó de sus sales. De las sales se pueden obtener las bases en forma en sí conocida. De éstas últimas a su vez, se pueden obtener las sales mediante reacción con ácidos que son adecuados para la formación de sales de aplicación terapéutica, tales, como, por ejemplo, aquellas con ácidos inorgánicos, tales como 25. hidrácidos halogenados, por ejemplo, el ácido clorhídrico ó el ácido bromhídrico, el ácido perclórico, el ácido nítrico ó el ácido tiocianico, los ácidos sulfúricos ó fosfóricos, ó los ácidos



- orgánicos, tales como el ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malóico, ácido succínico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tártrico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido hidroximaléico, ácido dihidroximaléico, ácido benzóico, ácido fenilacético, ácido 4-aminobenzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido antranílico, ácido cinamónico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzóico, ácido 2-acetoxibenzóico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalinsulfónico ó ácido sulfanílico.

- Los péptidos obtenidos según la presente invención se pueden emplear en forma de preparados farmacéuticos. Estos contienen los péptidos en mezcla con un excipiente orgánico ó inorgánico, farmacéutico, adecuado para aplicación enteral ó parenteral. Como tales entran aquellas sustancias en consideración que no reaccionan con los polipéptidos, tales como, por ejemplo, la gelatina, lactosa, glucosa, sal común, fécula, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, goma, polialquilenglicoles, vaselina, colesteroína u otros excipientes medicinales conocidos. Los preparados farmacéuticos se pueden presentar, por ejemplo, como liofilizado ó en forma líquida como soluciones, suspensiones ó emulsiones. En caso dado estarán esterilizados y/ó contendrán adyuvantes, tales como agentes de conservación, estabilización, humectación ó emulsión. Asimismo pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

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

372445



En la cromatografía de capa delgada se emplean los siguientes sistemas:

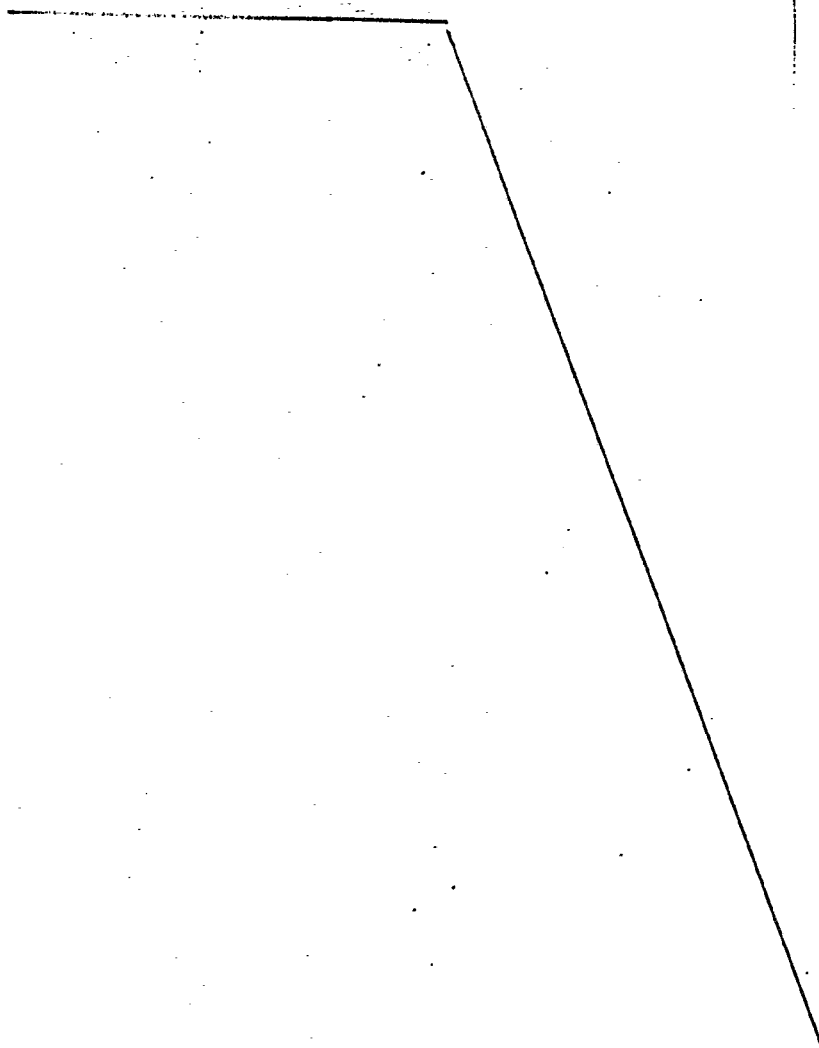
5. Sistema 43A : terc.-amilalcohol-isopropanol-agua (100:40:10)
- Sistema 43C : terc.-amilalcohol-isopropanol-agua (51:21:28)
- Sistema 45 : sec.-butanol-amoniaco acuoso al 3 % (70:30)
- Sistema 52 : n-butanol-ácido acético glacial-agua (75:7,5:21)
- Sistema 52A : n-butanol-ácido acético glacial-agua (67:10:23)
- Sistema 79 : n-butanol-piridina-agua (34:33:33)
- Sistema 87 : isopropanol-ácido acético glacial-agua (77:4:19)
10. Sistema 89 : éster acético-acetona-agua (72:24:4)
- Sistema 100 : acetato etílico-piridina-ácido acético glacial-agua
(62:21:6:11)
- Sistema 102E : éster acético-metiletilcetona-ácido acético glacial-agua (50:30:10:10)
- Sistema 107 : acetato etílico-piridina-agua (49:24:27)
15. Sistema 115 : acetato etílico-piridina-ácido fórmico-agua
(63:21:10:6)
- Sistema 121A : isopropanol-amoniaco(al 26 %)-agua (85:5:10)
- Sistema 1 : benceno-etanol (80:20)
- Sistema 2 : benceno-etanol (90:10)
- Sistema 4 : n-amilalcohol-ácido fórmico-agua (70:20:10)
20. Sistema 5 : n-butanol-ácido acético-agua (66,6:16,7:16,7)
- Sistema 6 : n-butanol-piridina-ácido acético-agua
(66,6:12,5:4,2:16,7)
- Sistema 7 : n-amilalcohol-piridina-agua (70:20:10)
- Sistema 8 : cloroformo-metanol-ácido acético glacial
(78,4:9,7:2,9)
25. Sistema 9 : benceno-etanol (70:30)
- Sistema 10 : benceno-Etanol (60:40)

372445

18 OCT.



La cromatografía de capa delgada se efectua sobre gel de sílice u óxido de aluminio ("Alox" D-0 de la firma Camag con un 8 % de yeso) ó sobre celulosa ("Selecta" 1440 de la firma Schleichter y Schuell).



372445 - 23 -

372445

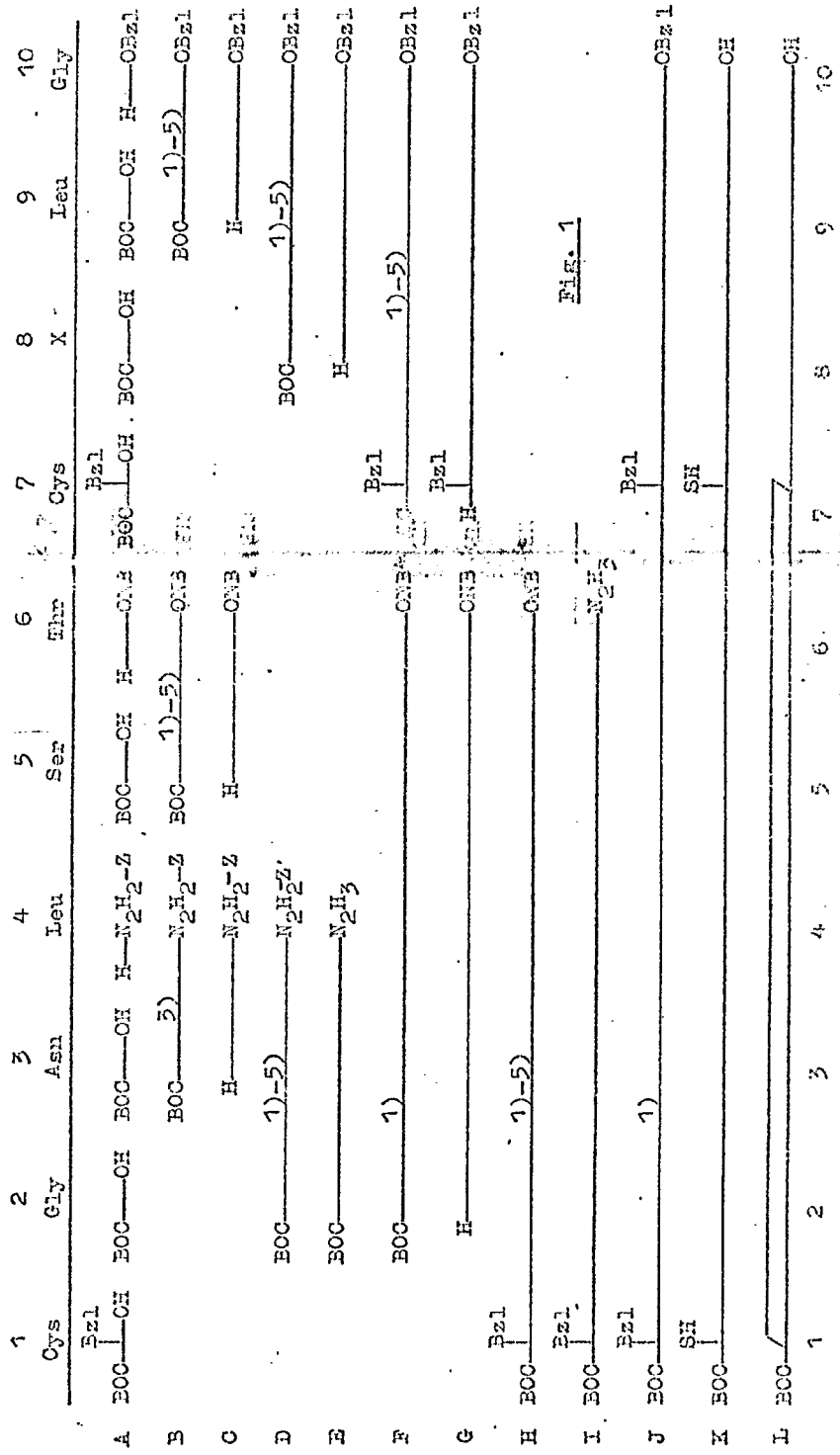


FIG. 1

	1 Cys	2 Gly	3 Asn	4 Leu	5 Ser	6 Thr	7 Cys
A	BOC- $\overset{\text{Bzl}}{\text{C}}\text{H}$	BOC-OH	BOC-OH	H-N ₂ H ₂ -Z	BOC-OH	H-OH	BOC- $\overset{\text{Bzl}}{\text{C}}\text{H}$
B			BOC-3)	N ₂ H ₂ -Z	BOC-1)-5)	OHB	SH
C			H-	N ₂ H ₂ -Z	H-	OHB	SH
D		BOC-1)-5)		N ₂ H ₂ -Z			
E		BOC-		N ₂ H ₃			
F		BOC-1)				OHB	BOC- $\overset{\text{Bzl}}{\text{C}}\text{H}$
G		H-				OHB	BOC- $\overset{\text{Bzl}}{\text{C}}\text{H}$
H	BOC- $\overset{\text{Bzl}}{\text{C}}\text{H}$		1)-5)			OHB	SH
I	BOC- $\overset{\text{Bzl}}{\text{C}}\text{H}$					N ₂ H ₃	
J	BOC- $\overset{\text{Bzl}}{\text{C}}\text{H}$		1)				BOC- $\overset{\text{Bzl}}{\text{C}}\text{H}$
K	BOC- $\overset{\text{SH}}{\text{C}}\text{H}$						SH
L	BOC- $\overset{\text{SH}}{\text{C}}\text{H}$						SH

372445

372445

372445

372445

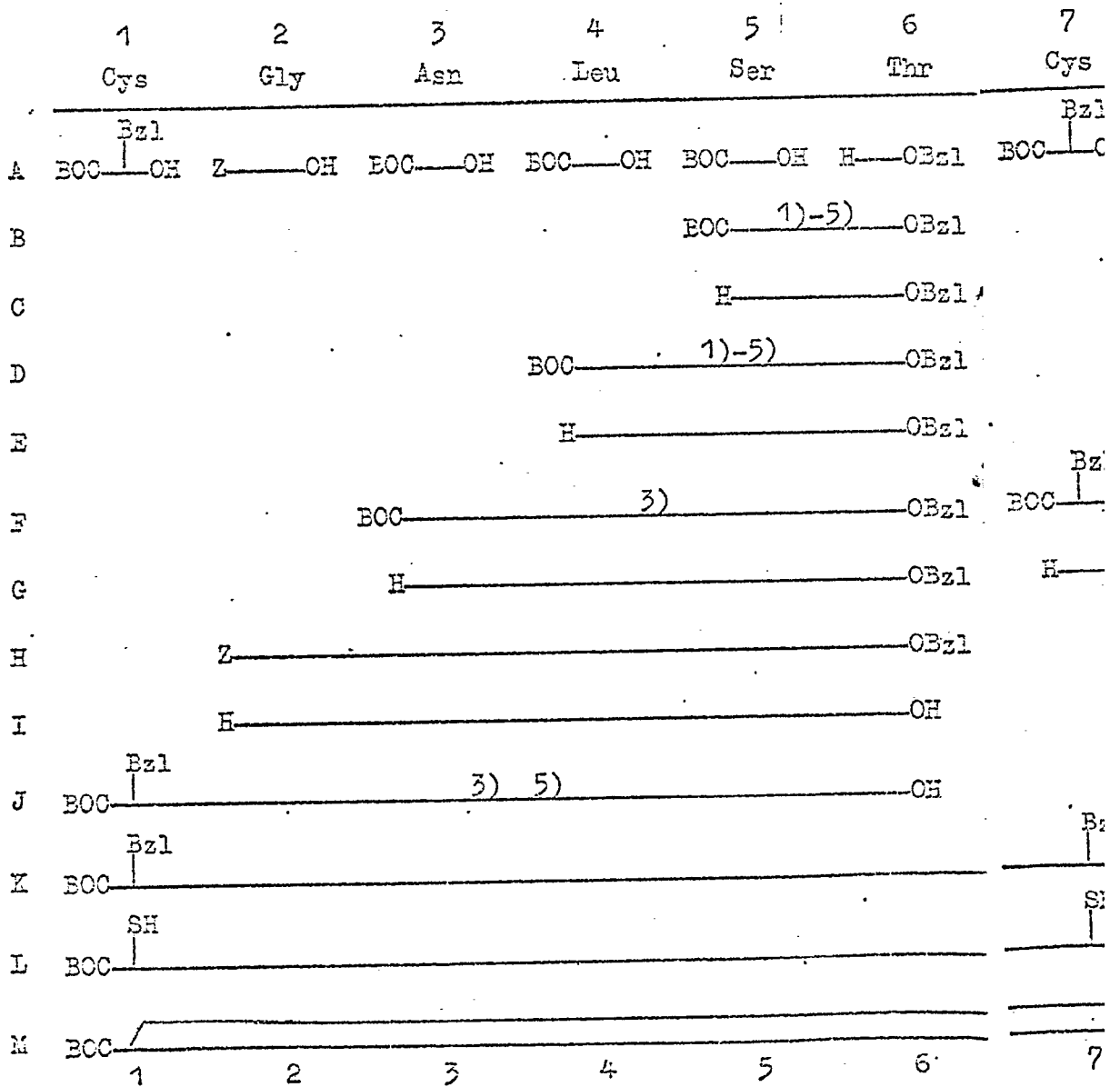


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	X	Leu	Gly
A	Bzl BOC-CH Z-CH EOC-CH EOC-CH H-OBzl						Bzl BOC-OH BOC-CH EOC-CH H-OBzl			
B					BOC-1)-5)-OBzl				BOC-1)-5)-OBzl	
C					H-OBzl				H-OBzl	
D				BOC-1)-5)-OBzl				BOC-1)-5)-OBzl		
E				H-OBzl				H-OBzl		
F			BOC-3)-OBzl				Bzl BOC-1)-5)-OBzl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

FIG. 2

372445

372445



372445

372445

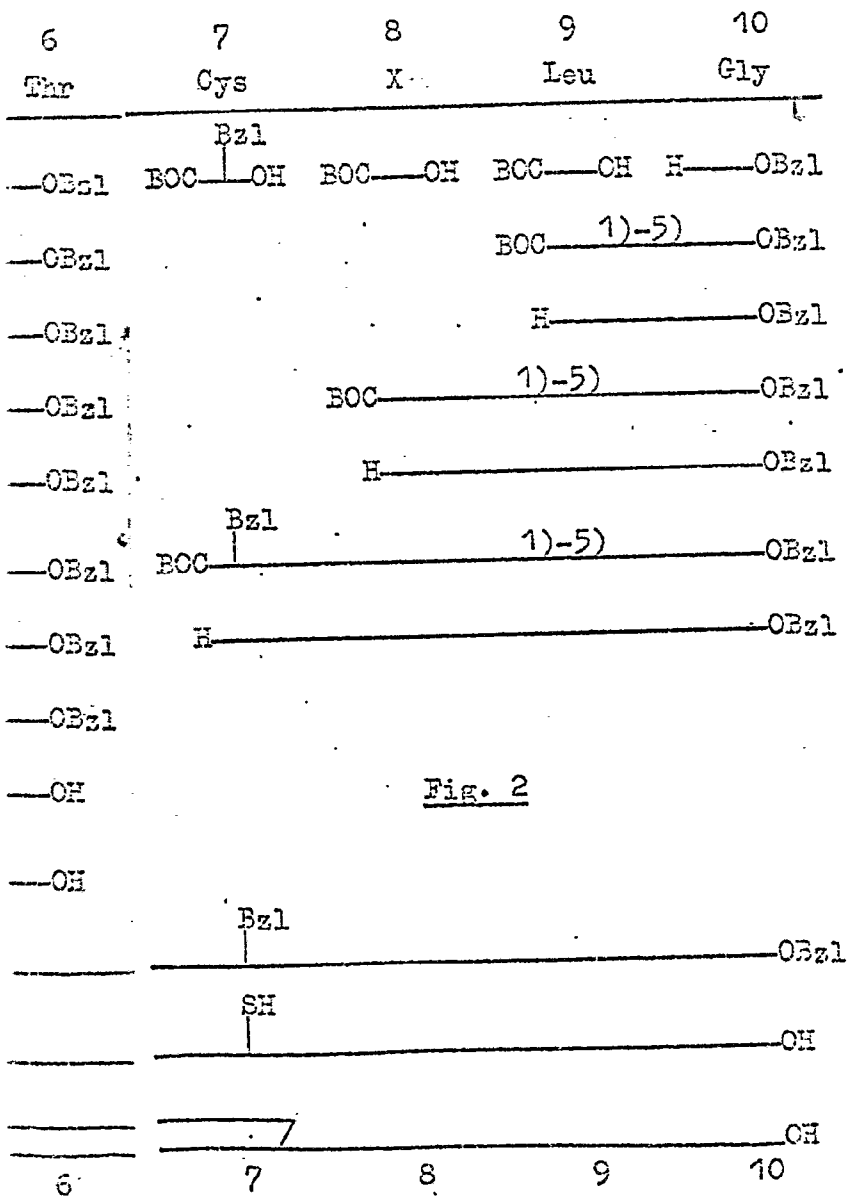


Fig. 2

372445

372445

372445

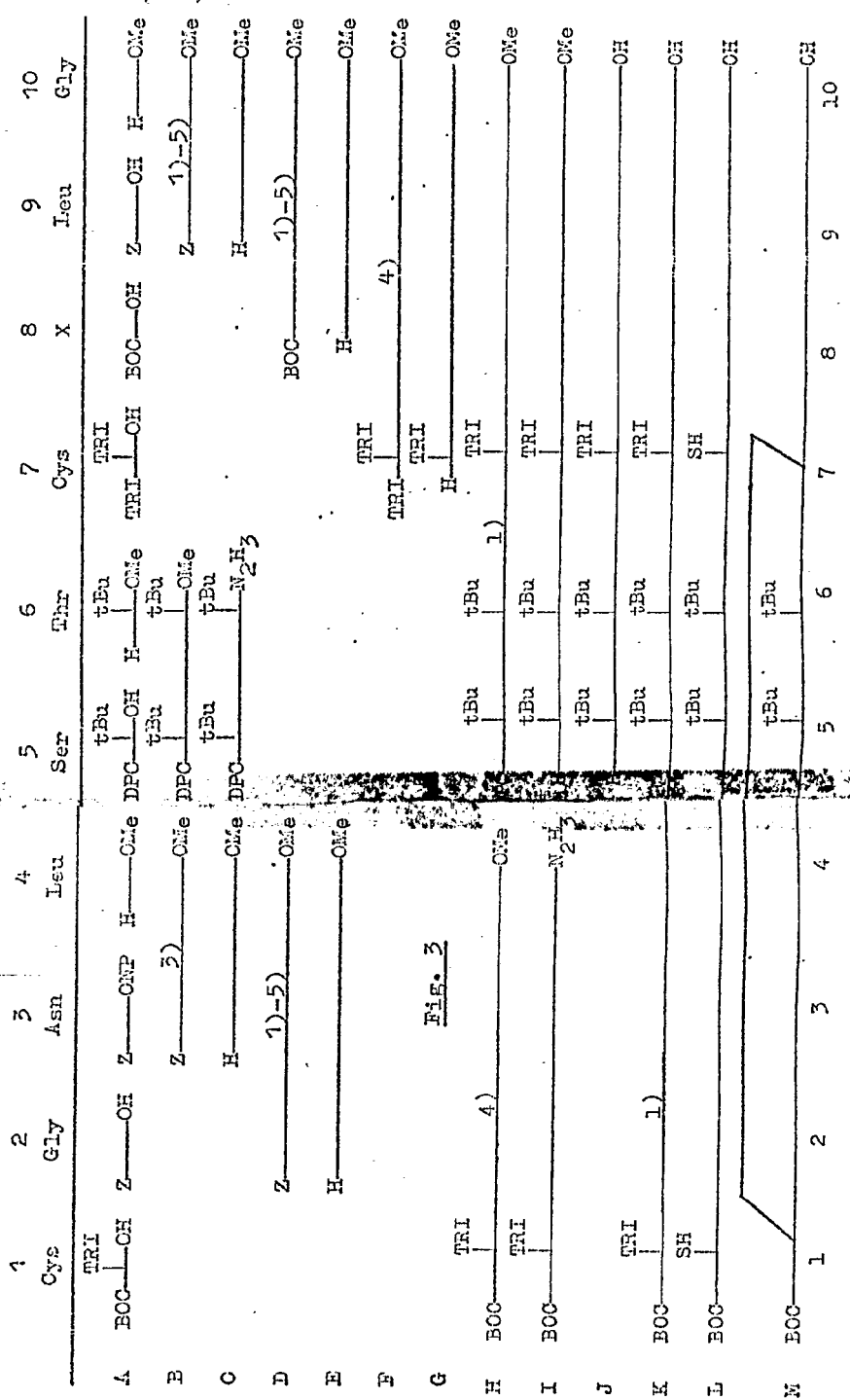
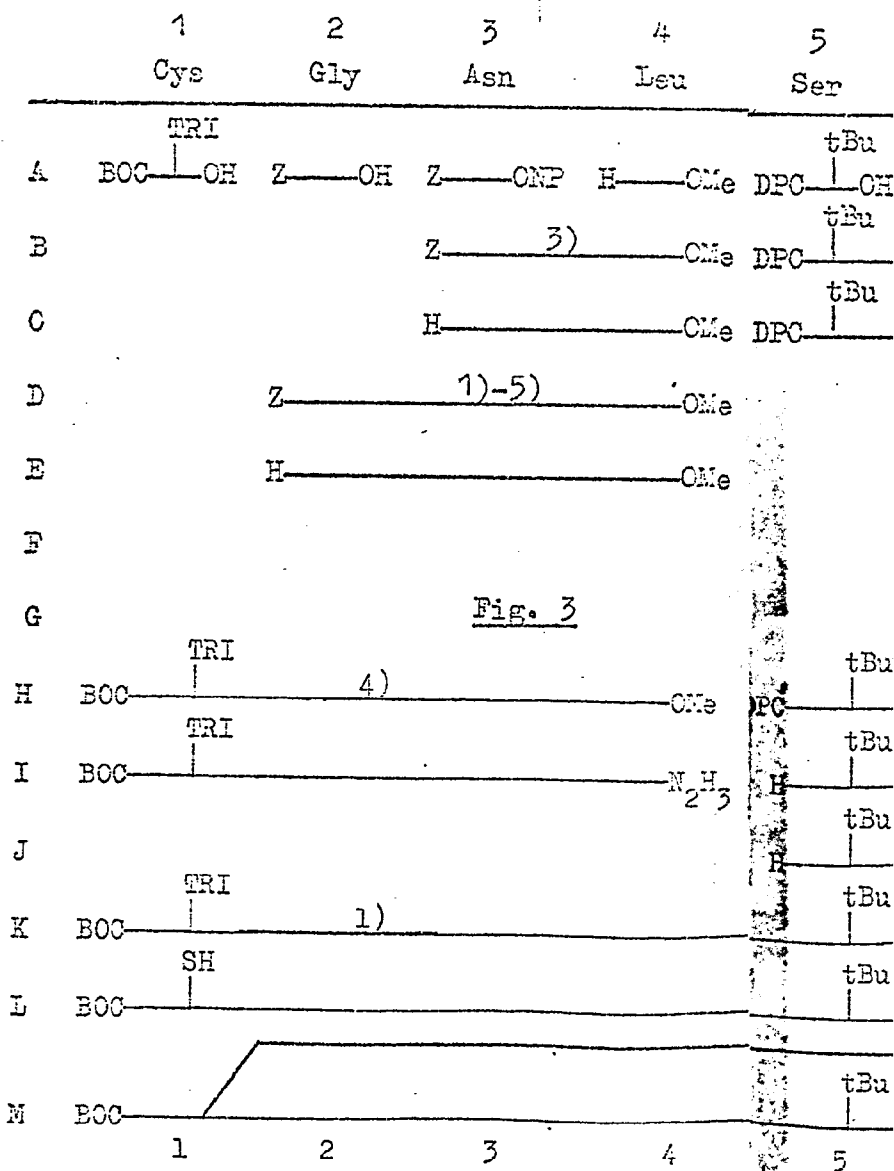


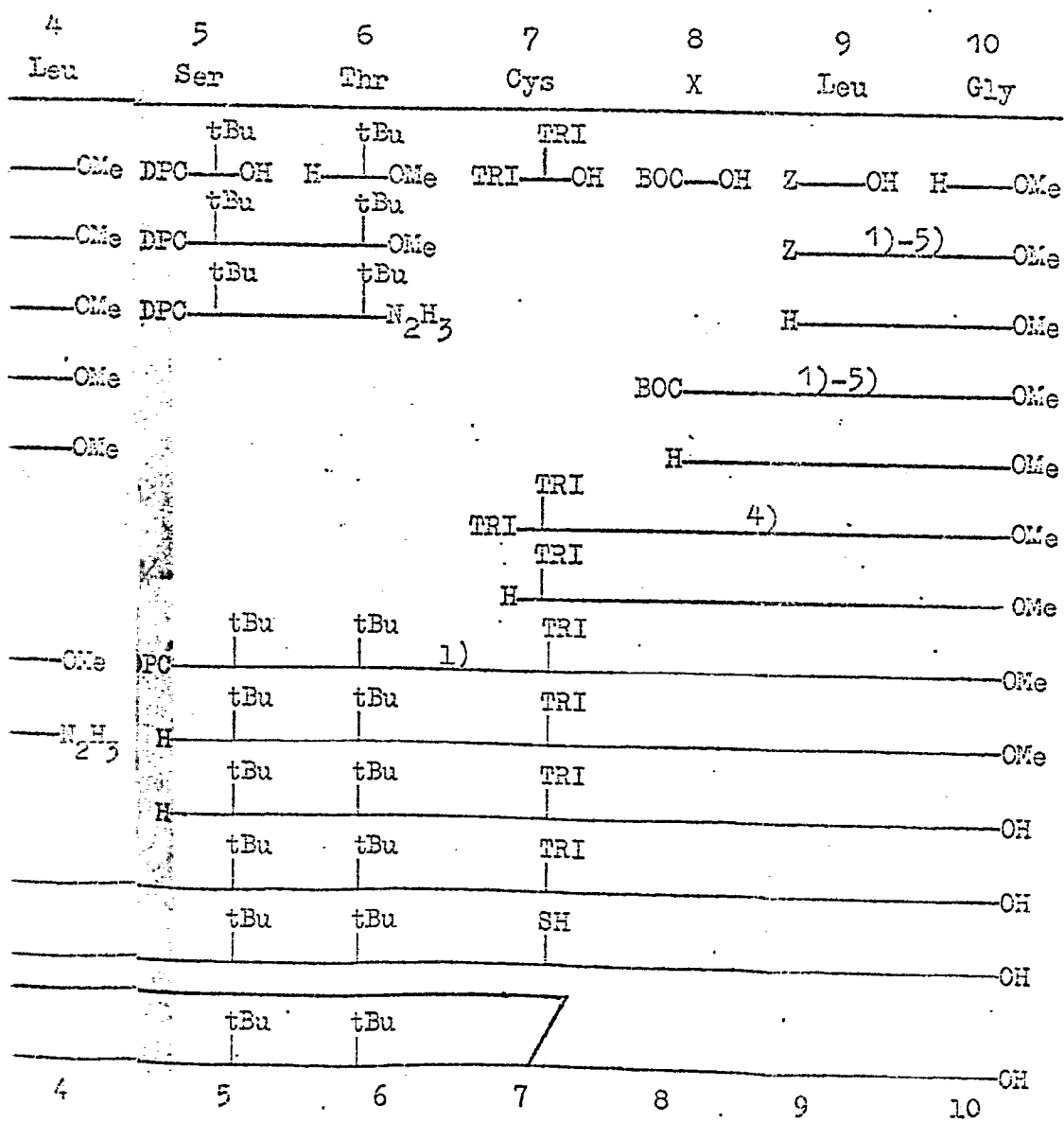
FIG. 3

372445



372445

372445



372445

372445

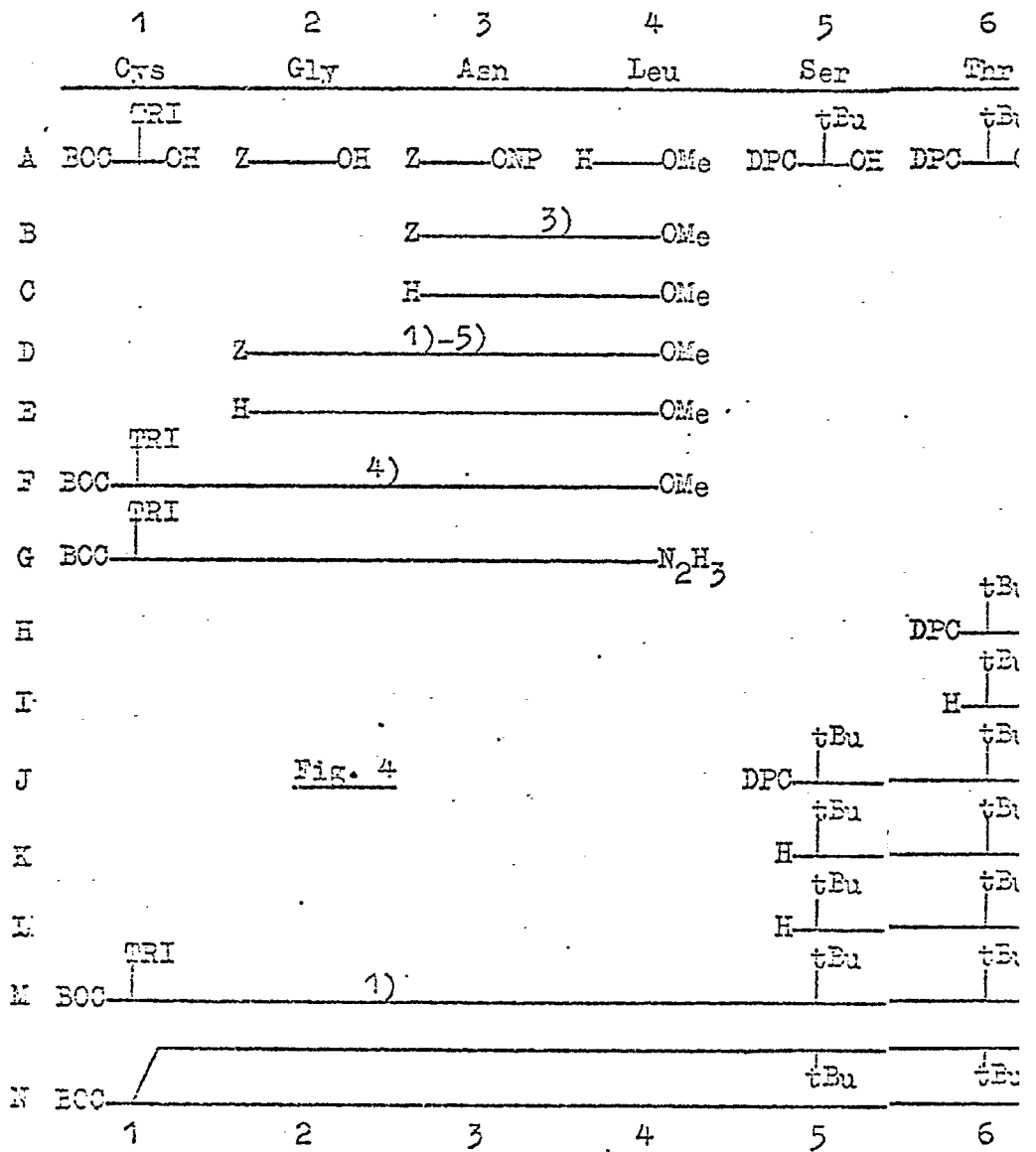
372445



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	X	Leu	Gly
A	BOC-TRT-CH	Z-OH	Z-CMP	H-OMe	DPC-OH	DPC-OH	TRT-CH	BOC-CH	Z-OH	H-OMe
B		Z	Z	OMe					Z	OMe
C			H	OMe					H	OMe
D		Z	1)-5)	OMe				BOC	1)-5)	OMe
E		H		OMe				H		OMe
F	BOC-TRT		4)	OMe			TRT		5)	OMe
G	BOC-TRT			NH ₂			TRT			OMe
H						tBu				OMe
I						DPC			1)-5)	OMe
J						H				OMe
K						tBu			1)-5)	OMe
L						H				OMe
M	BOC-TRT		1)			tBu				OH
N	BOC					tBu				OH

FIG. 4

372445



372445

372445



372445

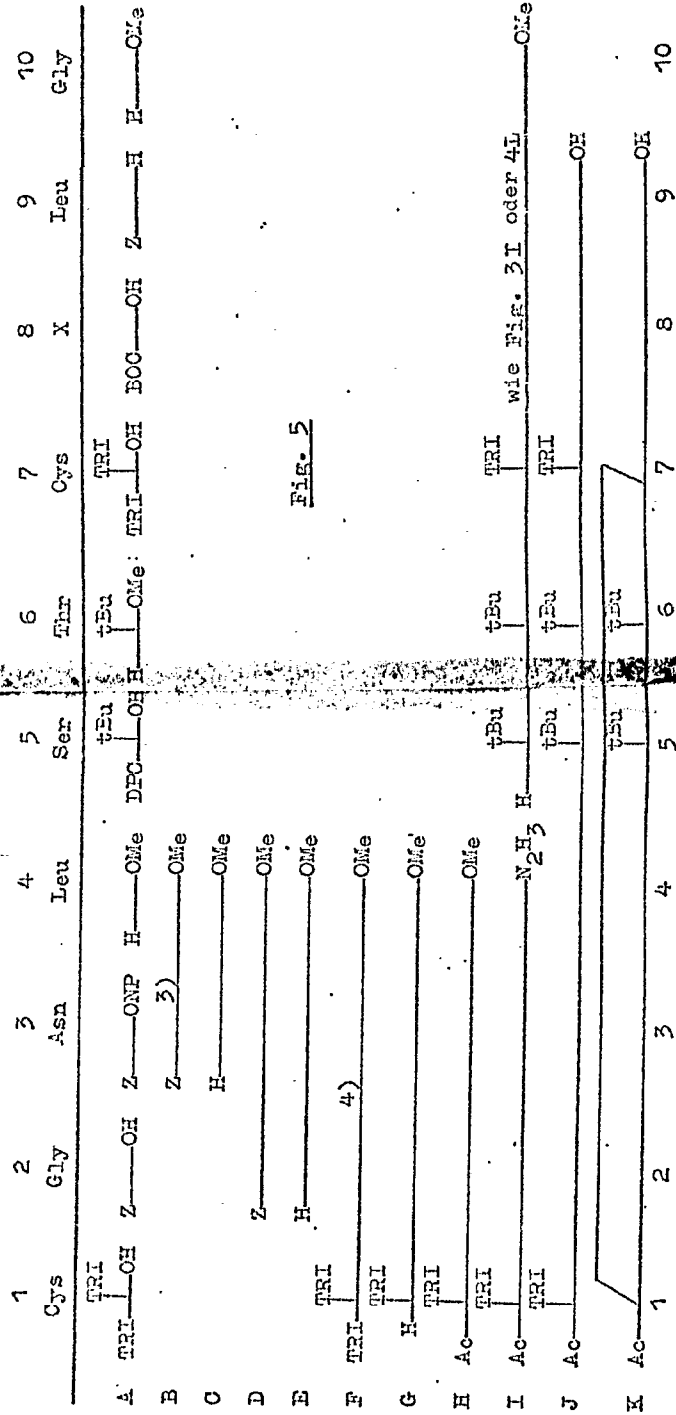
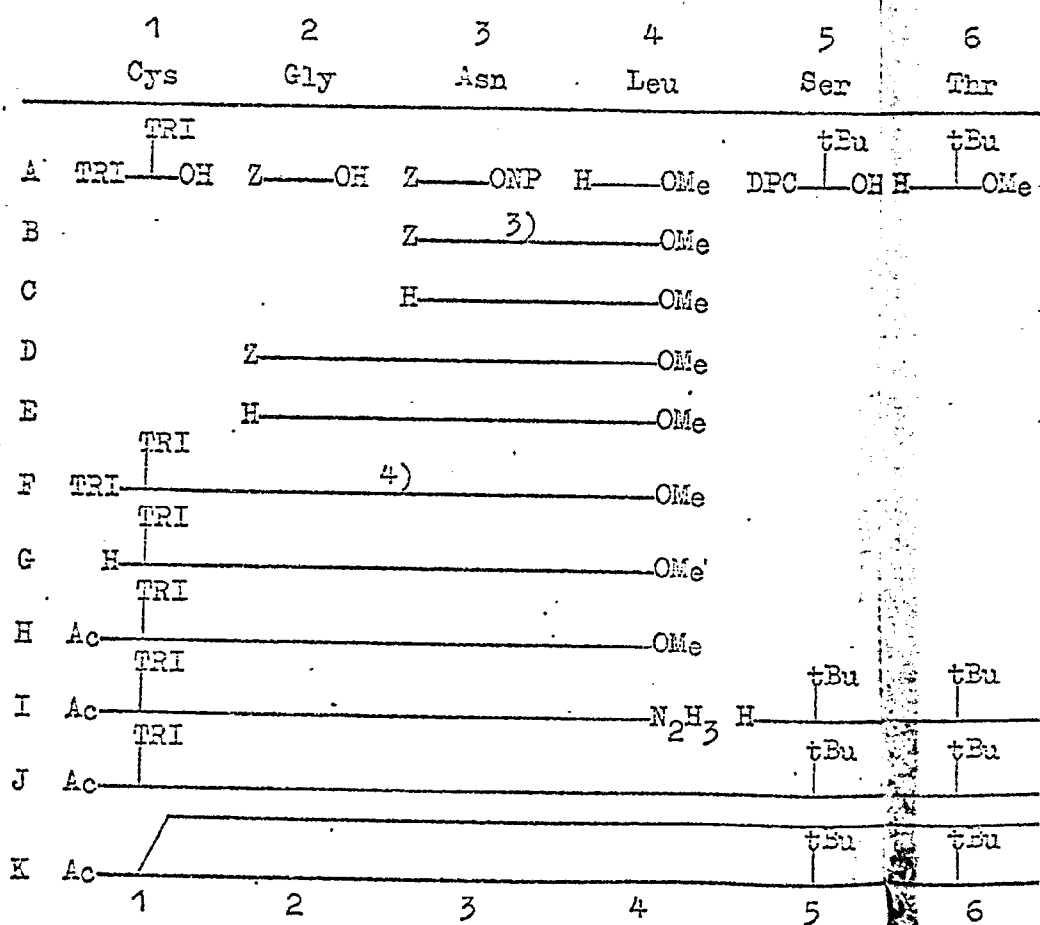


Fig. 5

372445



372445



372445

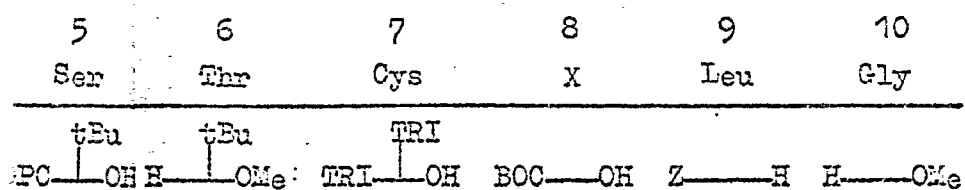
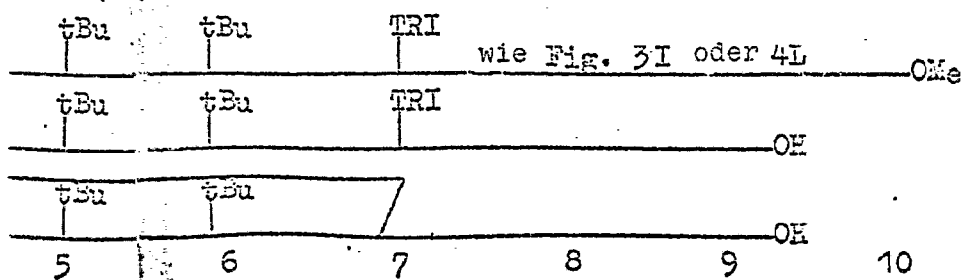


Fig. 5



372445

- 28 -

372445

372445

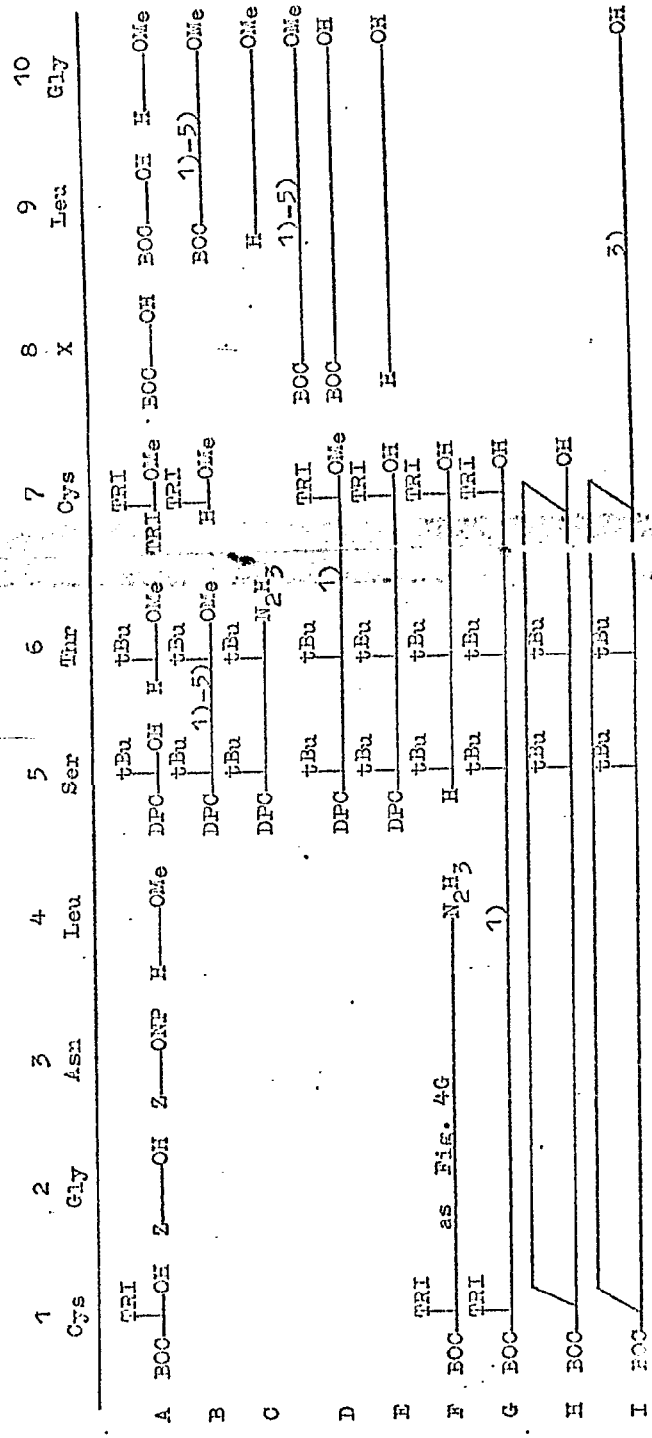


Fig. 6

372445

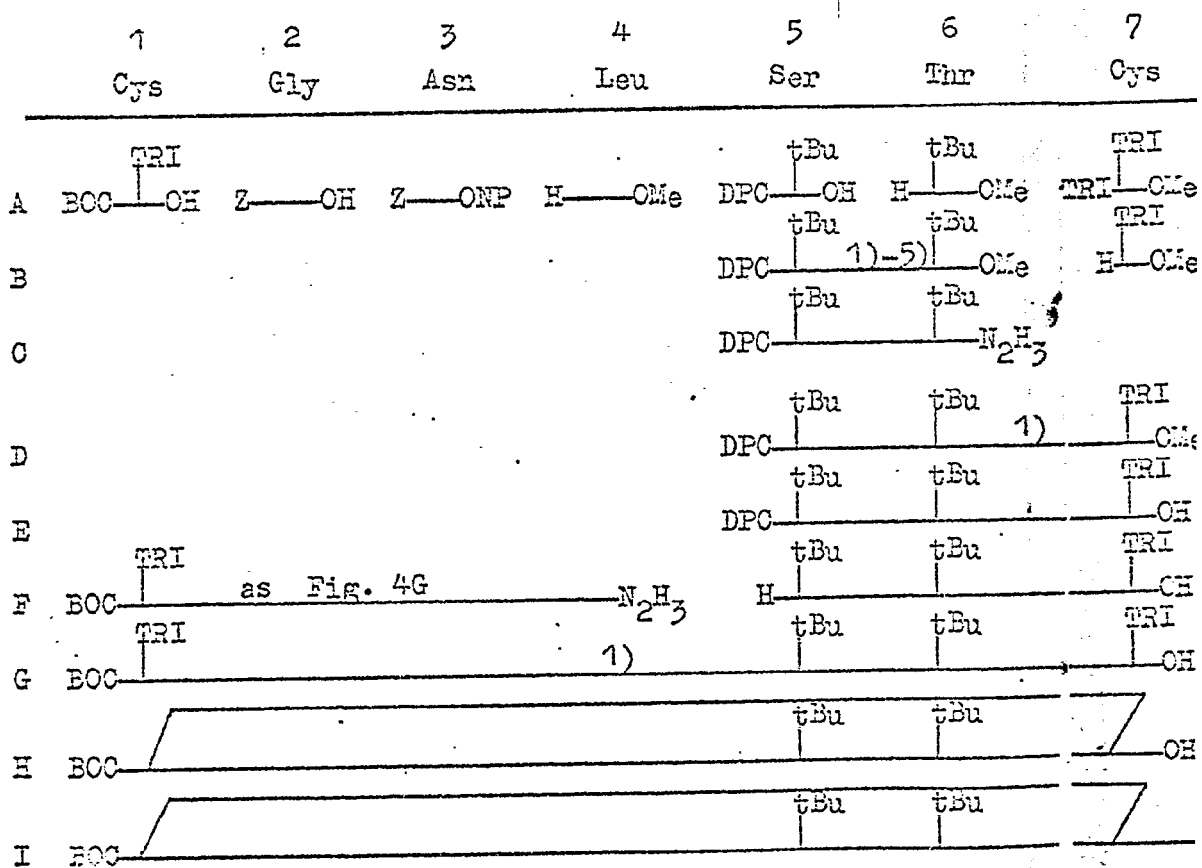
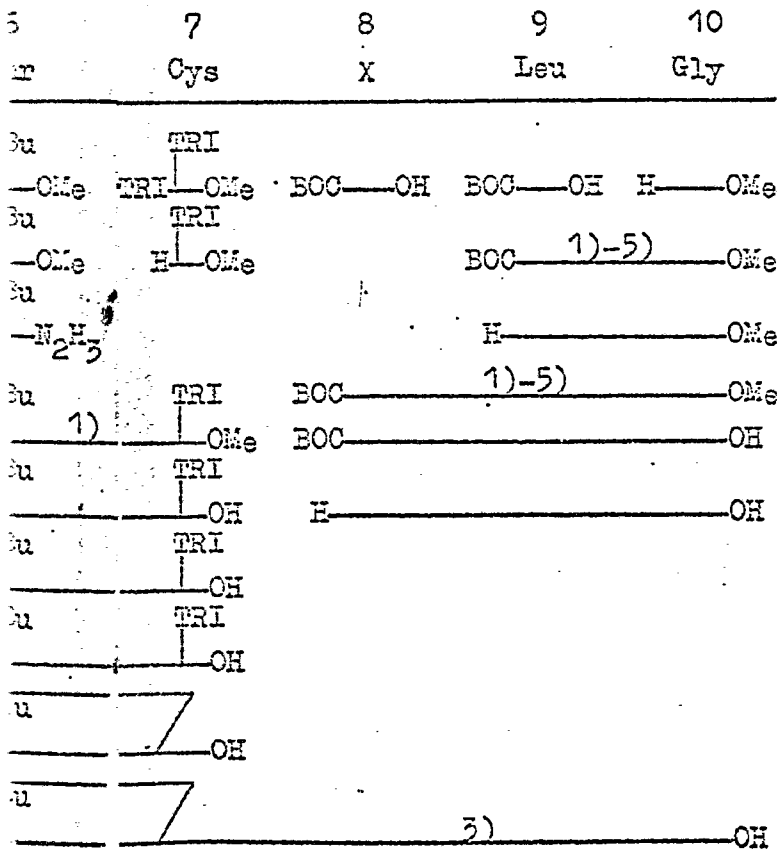


Fig. 6

372445

372445



372445

372445

372445



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	X	Leu	Gly
A	Bzl BCC-OSU	BCC-CMP	BCC-OH	BCC-CMP	BCC-CH	H-OBzl	H-OBzl	BCC-N ₂ H ₃	Z	OBzl
B					BCC-2)	4) 5)				OBzl
C					H-2)	OBzl		BCC-1)		OBzl
D					BCC-2)	OBzl		BCC-		OH
E					H-2) 4) 5)	OBzl		H-		OH
F					BCC-2) 4) 5)	OBzl				
G					H-2)	OBzl				
H					BCC-2)	OBzl				
I					BCC-2) 5)	OH				
J					BCC-2) 5)		Bzl			
K					H-2)		OBzl			
L	Bzl BCC-						Bzl			
M							OBzl			
N							Bzl			
O							OBzl		2)	OH

FIG. 7

372445

	1 Cys	2 Gly	3 Asn	4 Leu	5 Ser	6 Thr
A	BOC- ^{Bzl} OSU	BOC-ONP	BOC-OH	BOC-ONP	BOC-OH	H
B					BOC- ²⁾	4) 5)
C					H	
D				BOC	²⁾	
E				H		
F			BOC		2) 4) 5)	
G			H			
H		BOC		3)		
I		BOC				
J		BOC		2) 5)		
K		H				
L	BOC- ^{Bzl}			3)		
M	BOC					
N	BOC					
O	BOC					

372445

372445

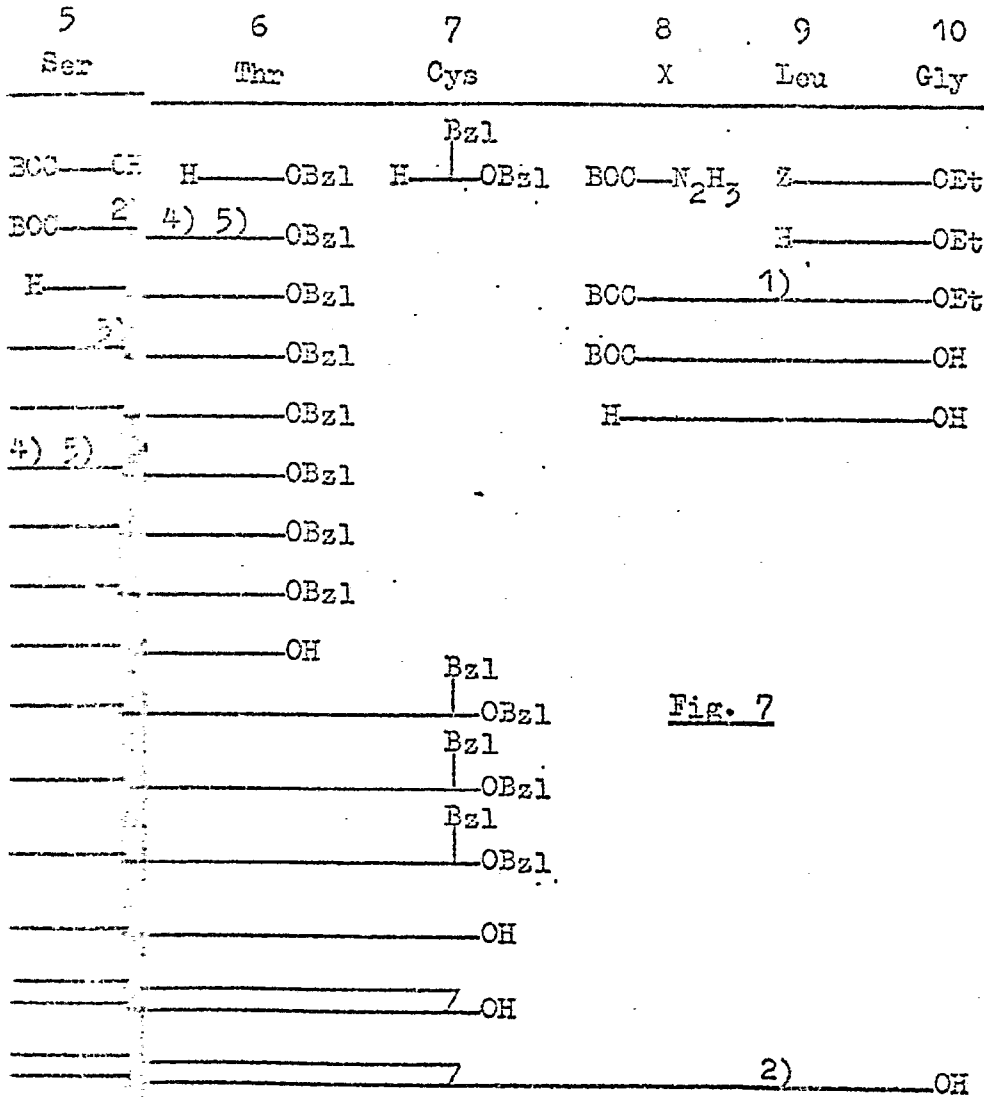


Fig. 7

372445

372445

372445



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	X	Leu	Gly
A	Bzl BOC- <u>CSU</u>	BOC- <u>OMP</u>	BOC- <u>OH</u>	BOC- <u>OMP</u>	BOC- <u>CH</u>	H- <u>OBzl</u>	H- <u>N₂H₂Z</u>	BOC- <u>N₂H₃</u>	Z	OBzl
B					BOC- <u>2) 4)</u>	5)- <u>OBzl</u>			H	OBzl
C					H	OBzl		BOC		OBzl
D					BOC- <u>3)</u>	OBzl		BOC		OBzl
E					H	OBzl		BOC		OH
F					BOC- <u>2) 4) 5)</u>	OBzl		H		OH
G					H	OBzl				
H					BOC- <u>3)</u>	OBzl				
I					BOC	OBzl				
J					BOC- <u>2) 5)</u>	OH				
K					H	Bzl N ₂ H ₂ -Z				
L	Bzl BOC					Bzl N ₂ H ₂ -Z				
M						Bzl N ₂ H ₂ -Z				
N						Bzl N ₂ H ₂ -Z				
O						N ₂ H ₃				OH

Fig. 8

1)

372445

	1 Cys	2 Gly	3 Asn	4 Leu	5 Ser	6 Thr
A	BOC- ^{Bzl} OSU	BOC-ONP	BOC-OH	BOC-ONP	BOC-OH	H-OBzl
B					BOC-2) 4)	5) OBzl
C					H-	OBzl
D				BOC-	3)	OBzl
E				H-		OBzl
F			BOC-		2) 4) 5)	OBzl
G			H-			OBzl
H		BOC-		3)		OBzl
I		BOC-				OH
J		BOC-		2) 5)		
K		H-				
L	BOC- ^{Bzl}					
M	BOC-					
N	BOC-					
O	BOC-					

372445

372445

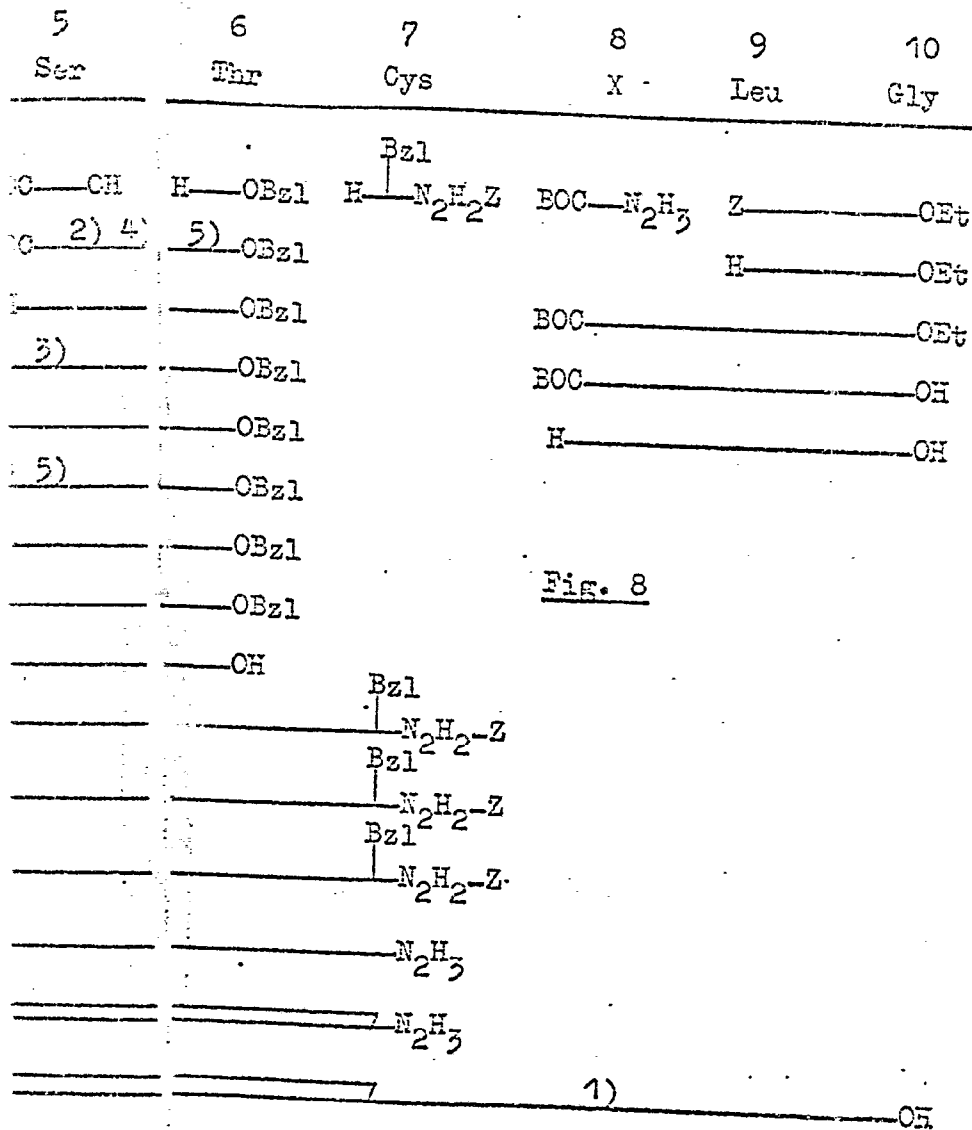
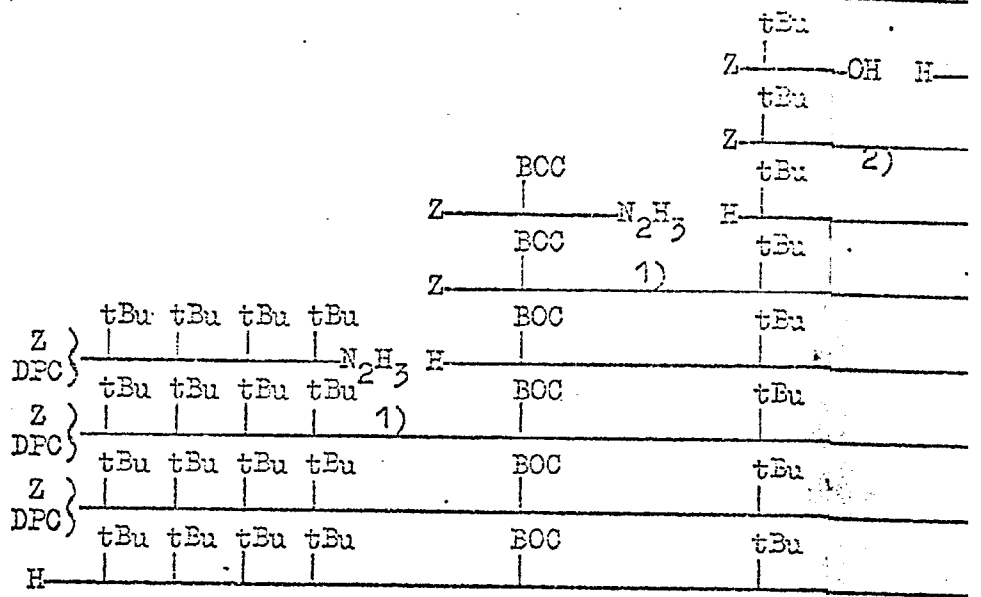


Fig. 8

372445

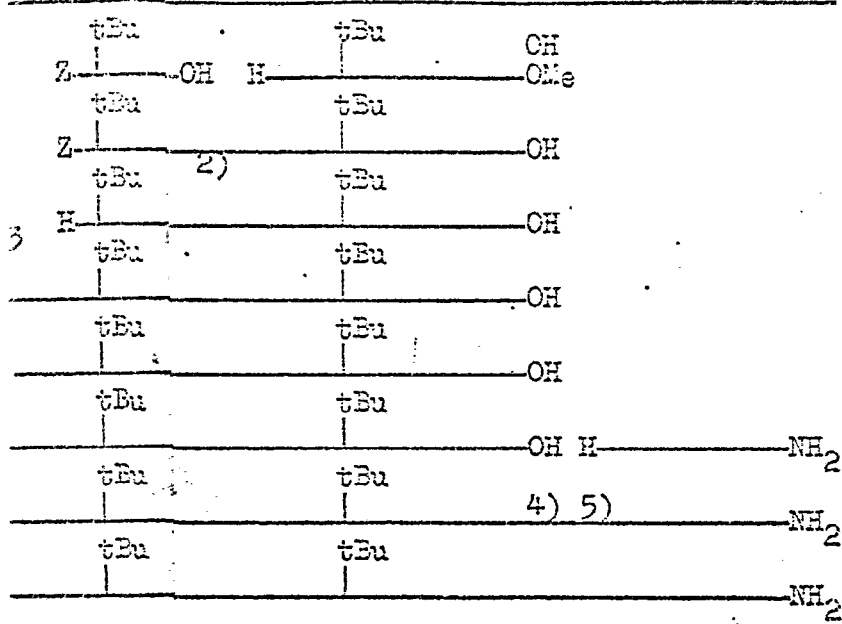
10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
 Thr Tyr Thr Gln Asp Phe Asn Lys Phe His Thr Phe Pro Gln



372445



21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
 Thr Phe Pro Gln Thr Ala Ile Gly Val Gly Ala Pro



372445

Fig. 9

372445

372445

372445



	11 Tyr	12 Tyr	13 Tyr	14 Gln	15 Asp	16 Phe
A	Z DFO { tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						
I						
J	Z DFO { tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH
K	Z DFO { tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH	Z tBu OH

Fig. 10

372445

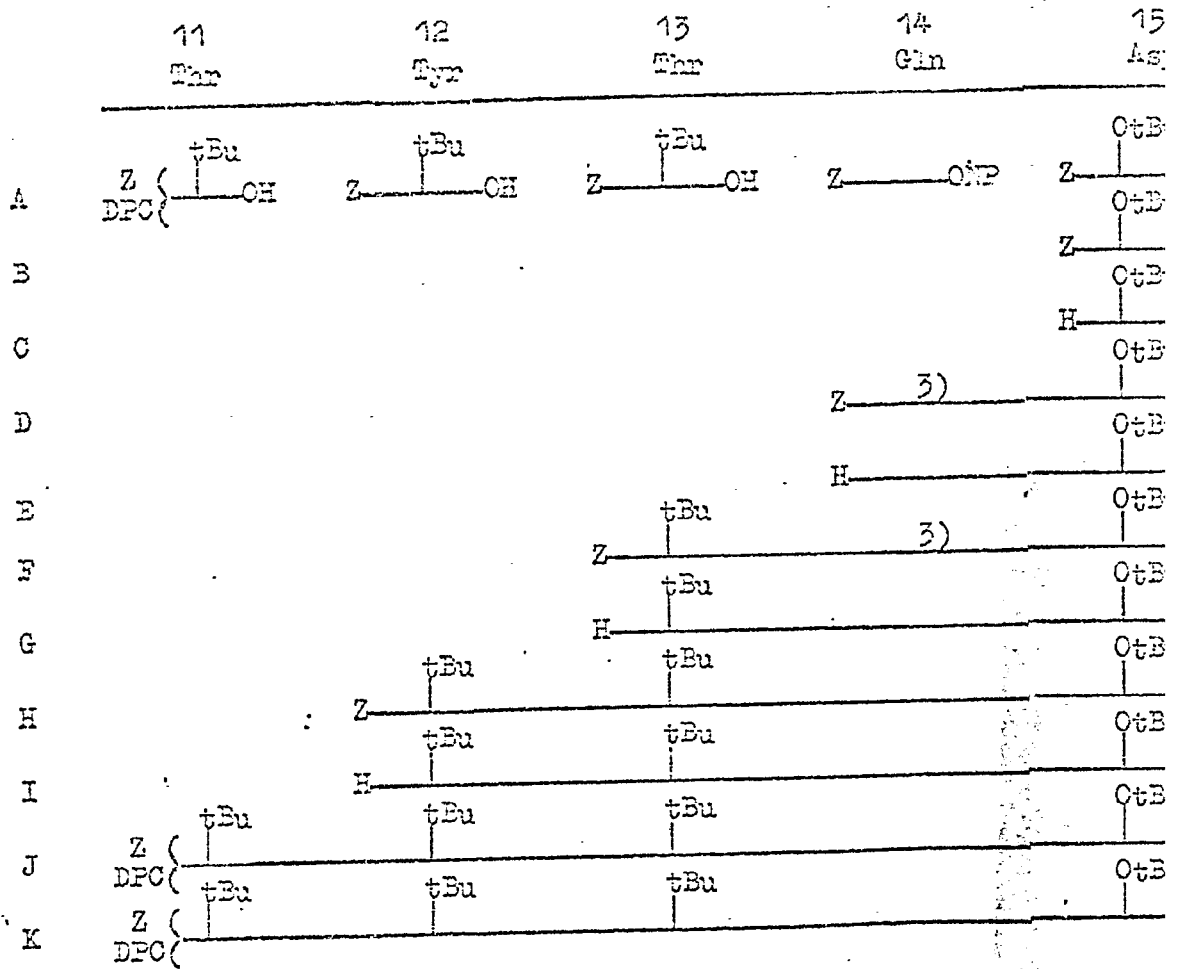
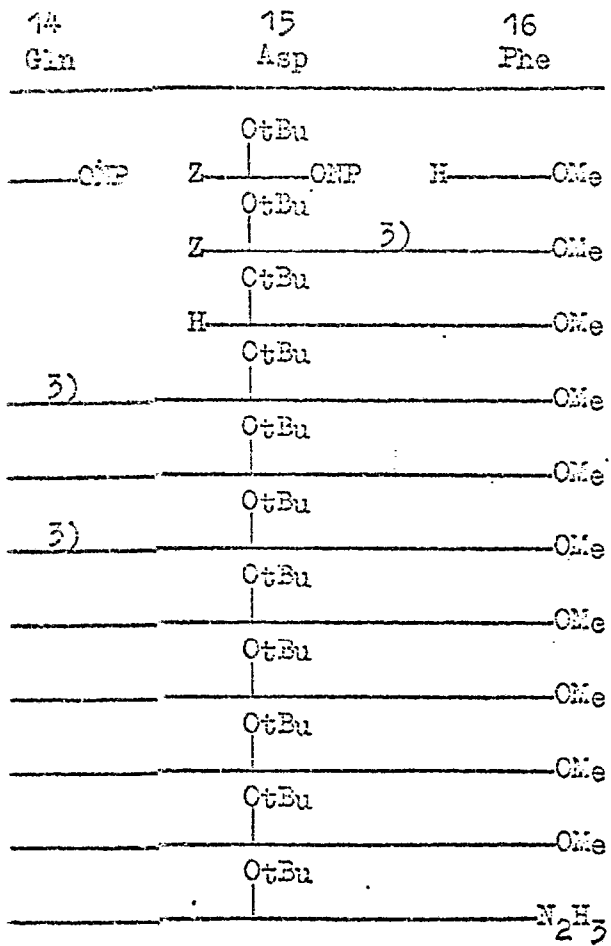


Fig. 10

372445

372445



372445

372445

372445

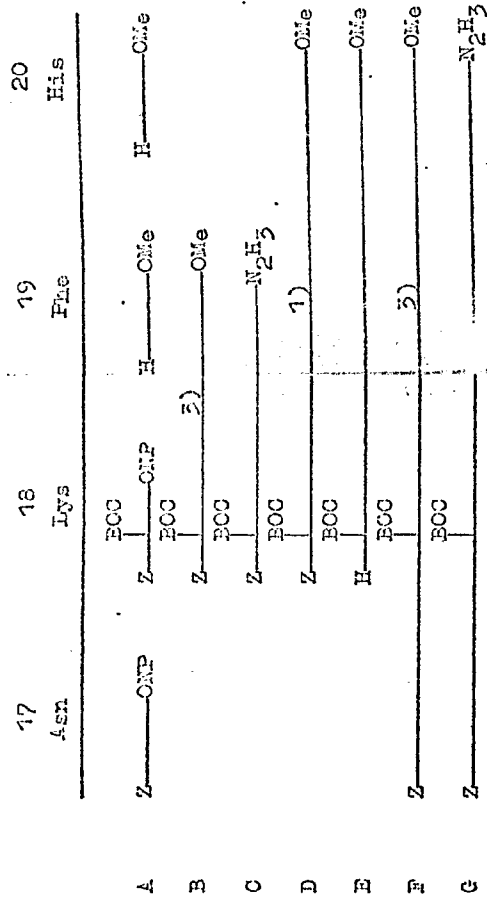


Fig. 11

372445

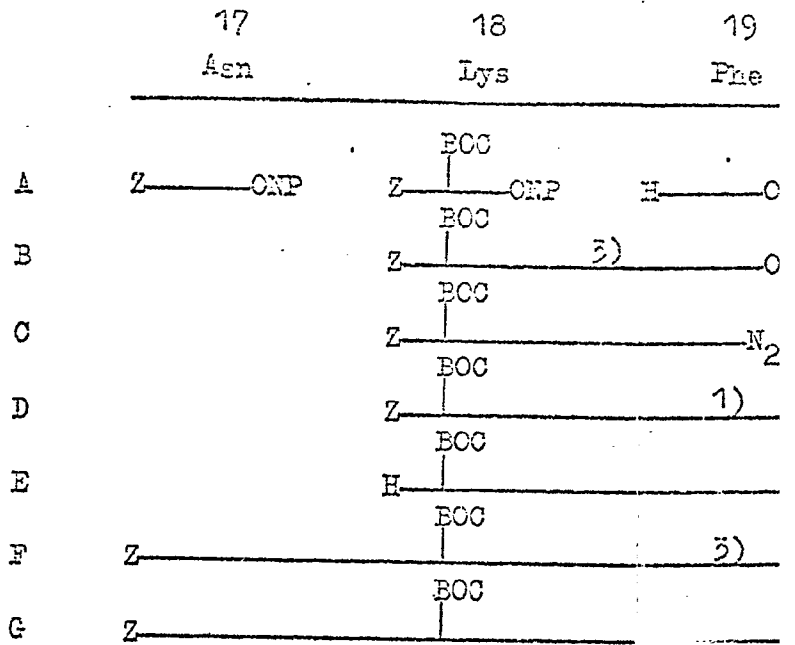


Fig. 11

372445

372445

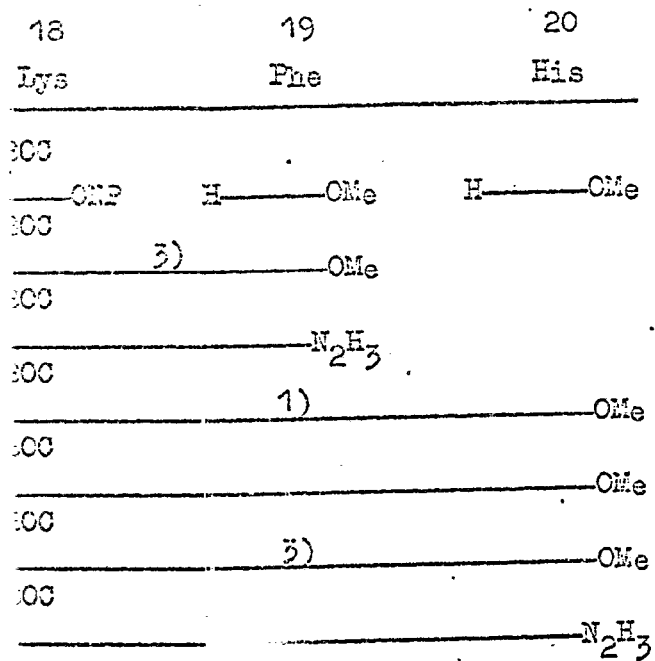


Fig. 11

372445

372445

372445

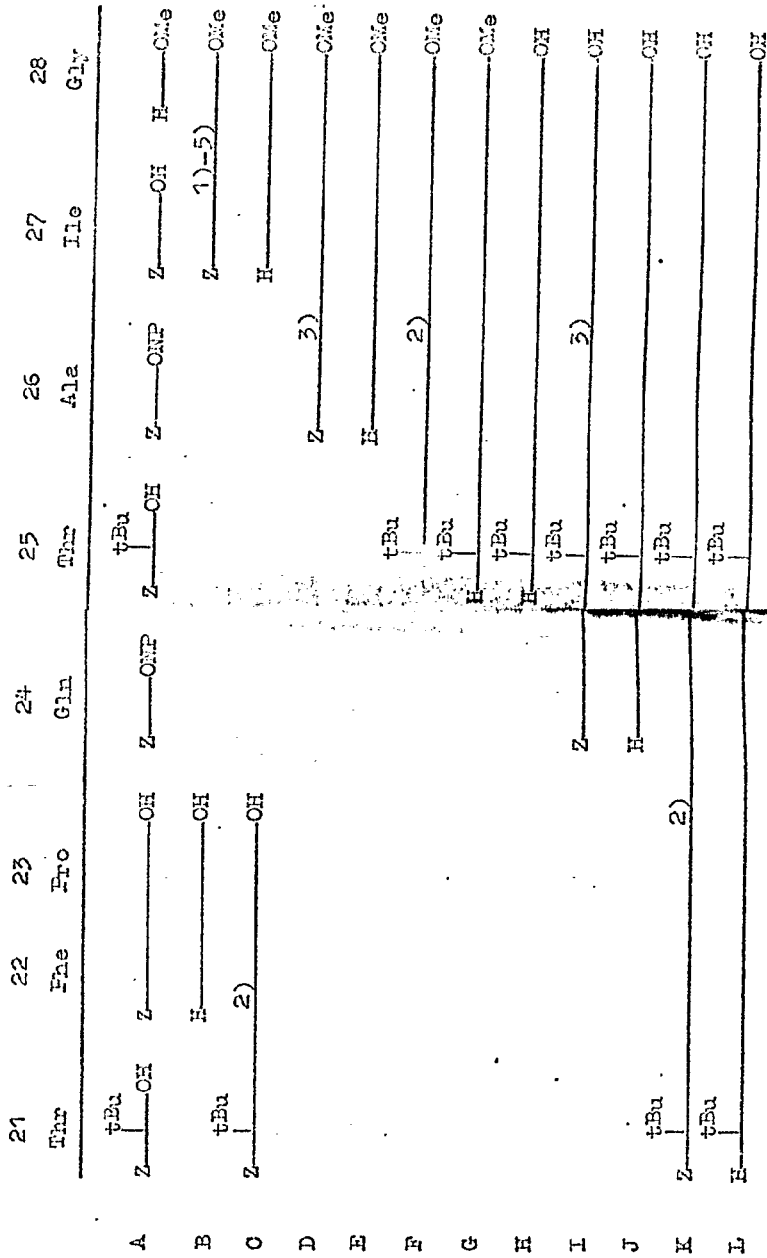


Fig. 12

372.45

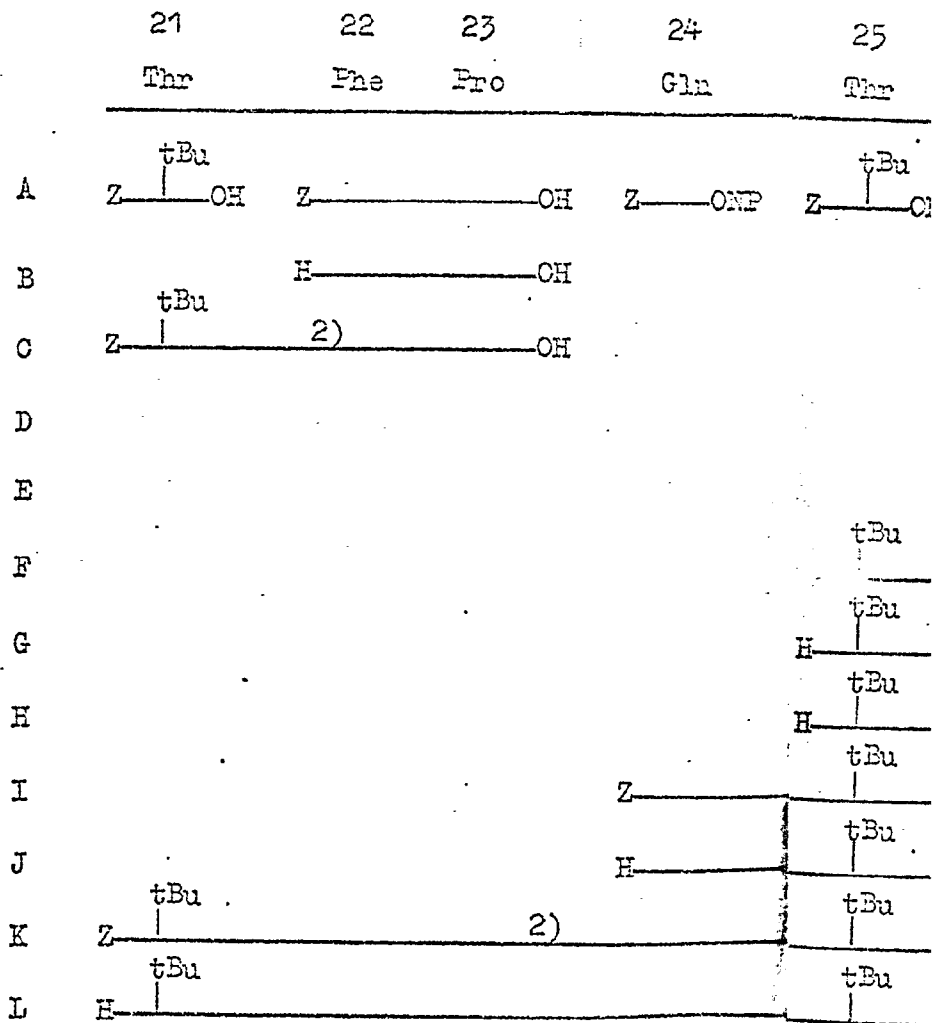


Fig 12

372445

372445

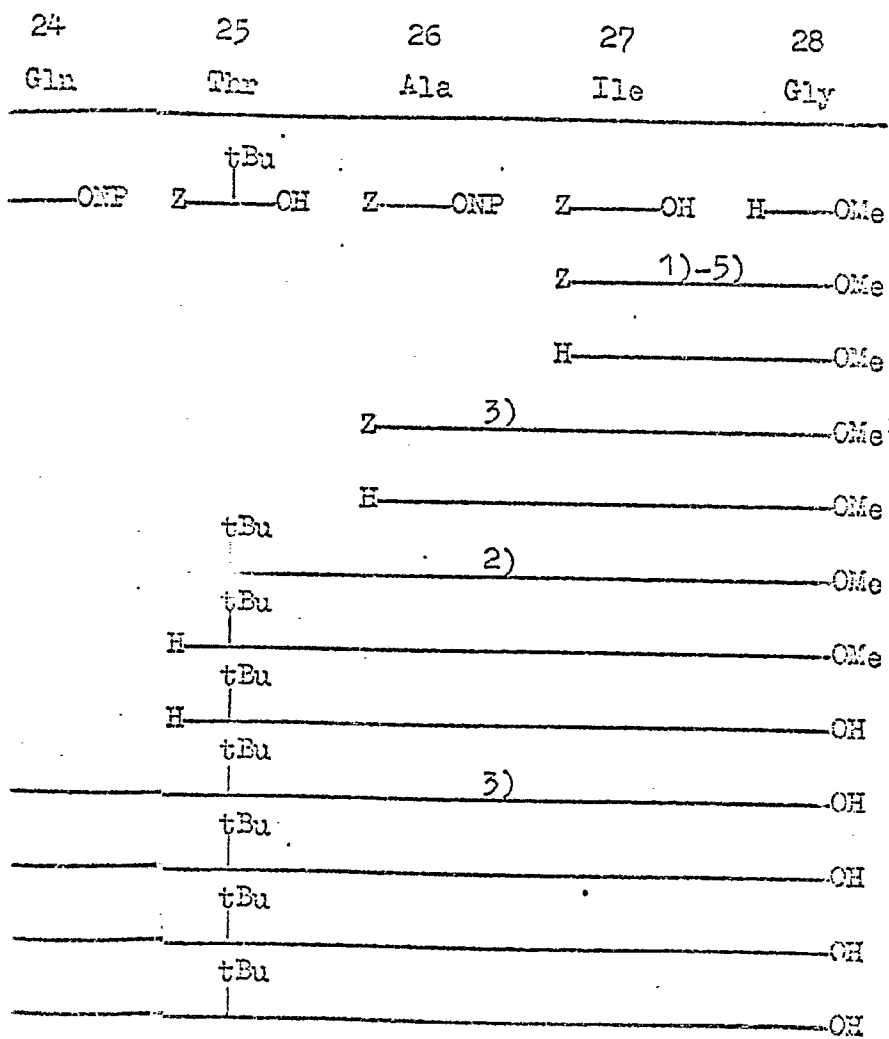
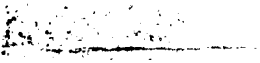


Fig 12

372445

372445



372445

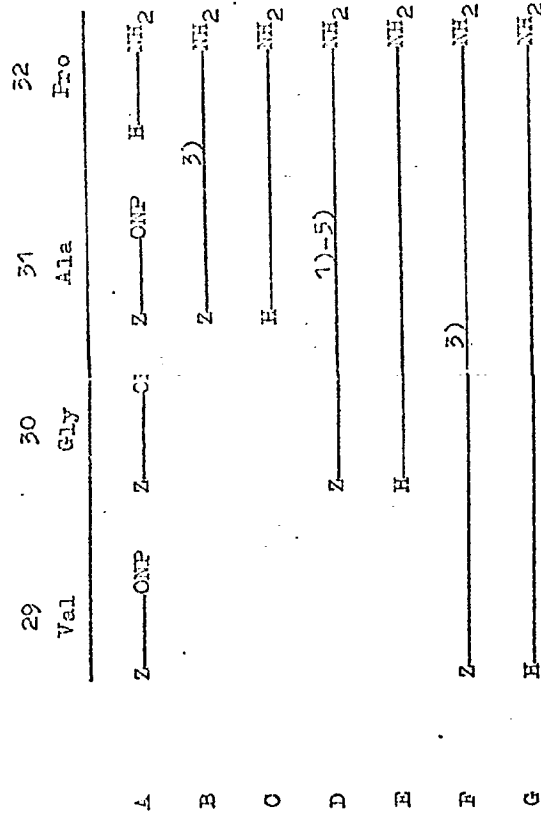


Fig 13

372445

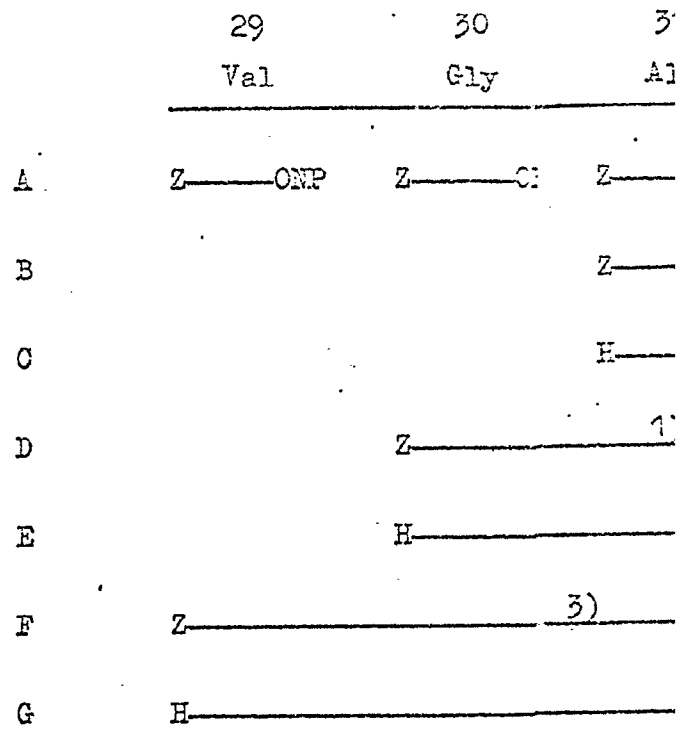


Fig 13

372445

372445

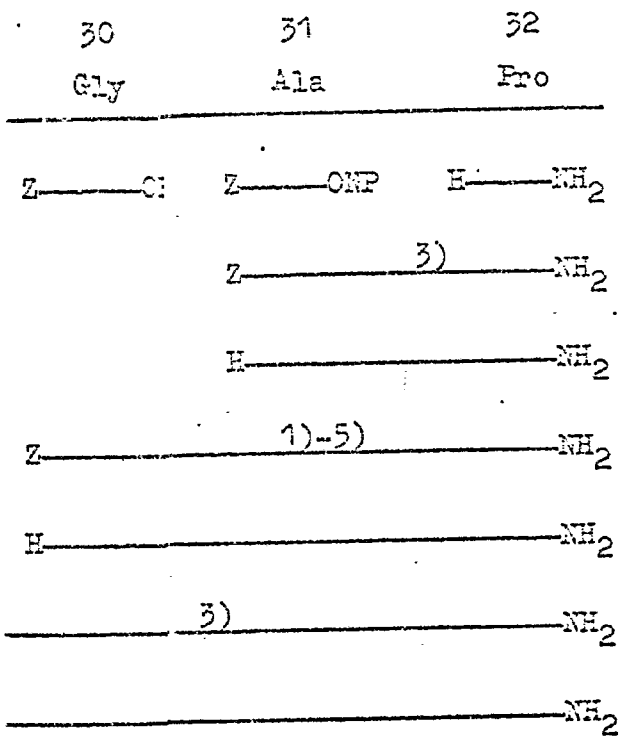


Fig 13

372445



372445

372445

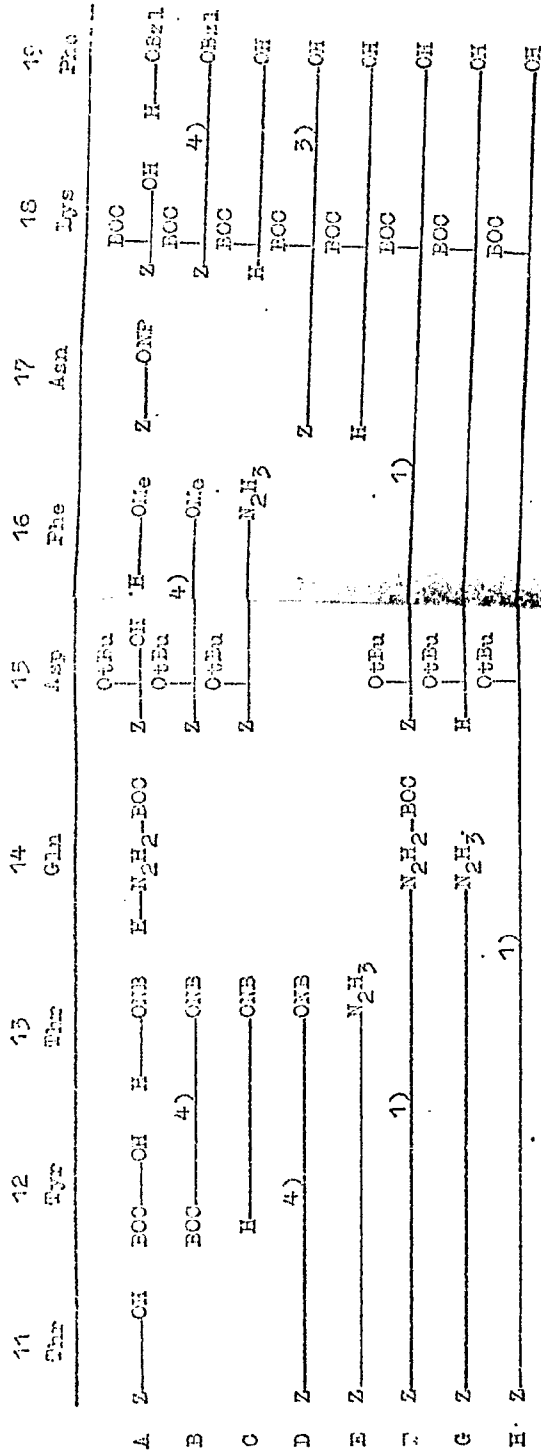


Fig. 14

372445

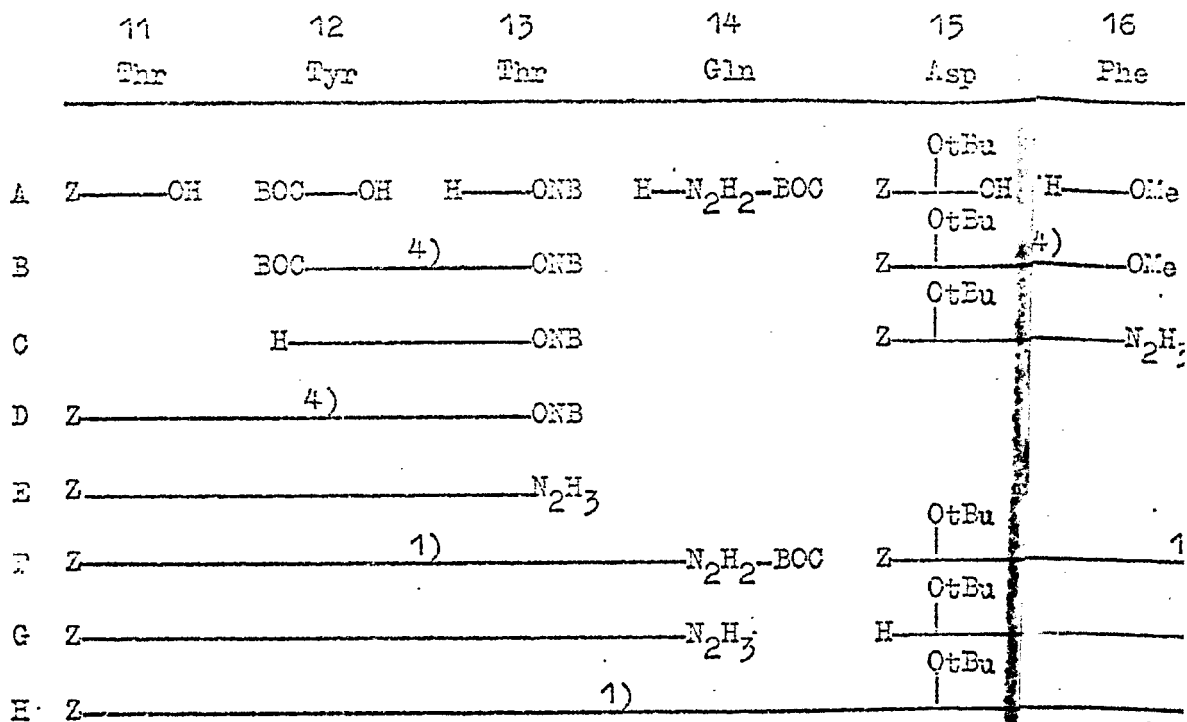


Fig. 14

372445

372445

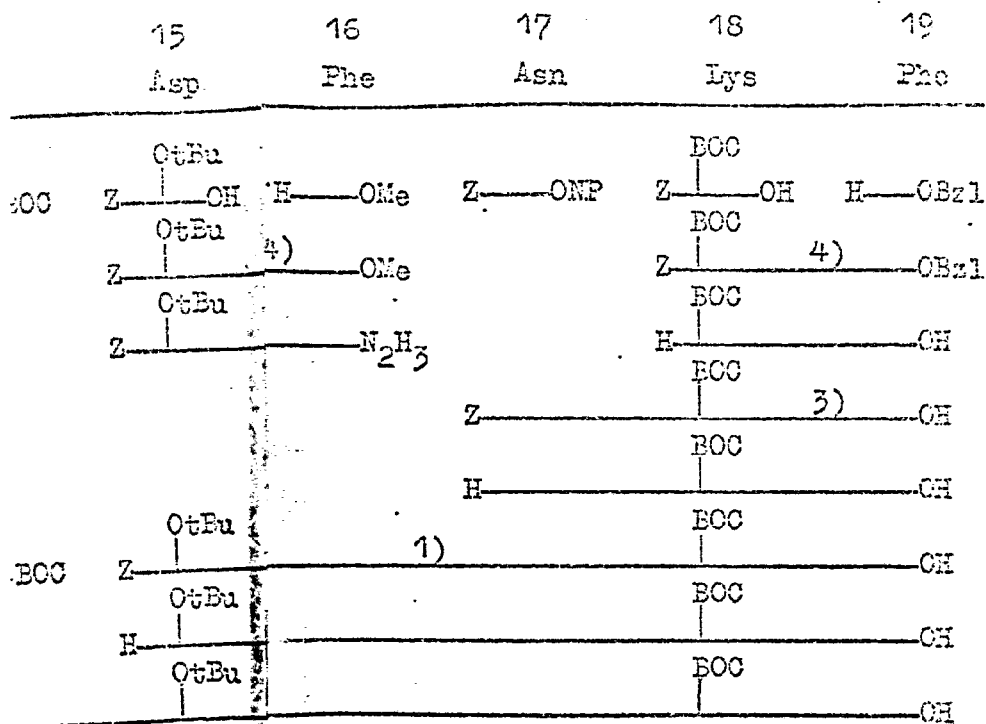
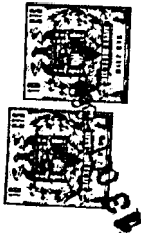


Fig. 14

372445

372445

372445



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

Fig 15

372445

	20 His	21 Thr	22 Phe	23 Pro	24 Gln	25 Thr	26 Ala
A	Z-N ₂ H ₃	Z-N ₂ H ₃	Z-ONP	Z-CH	H-N ₂ H ₂ -BOC	BOC-N ₂ H ₂	Z-CH Z-
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		
E			H-		N ₂ H ₂ -BOC		
F		Z-1)			N ₂ H ₂ -BOC	BOC-	1)
G		H-			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

372445

372445

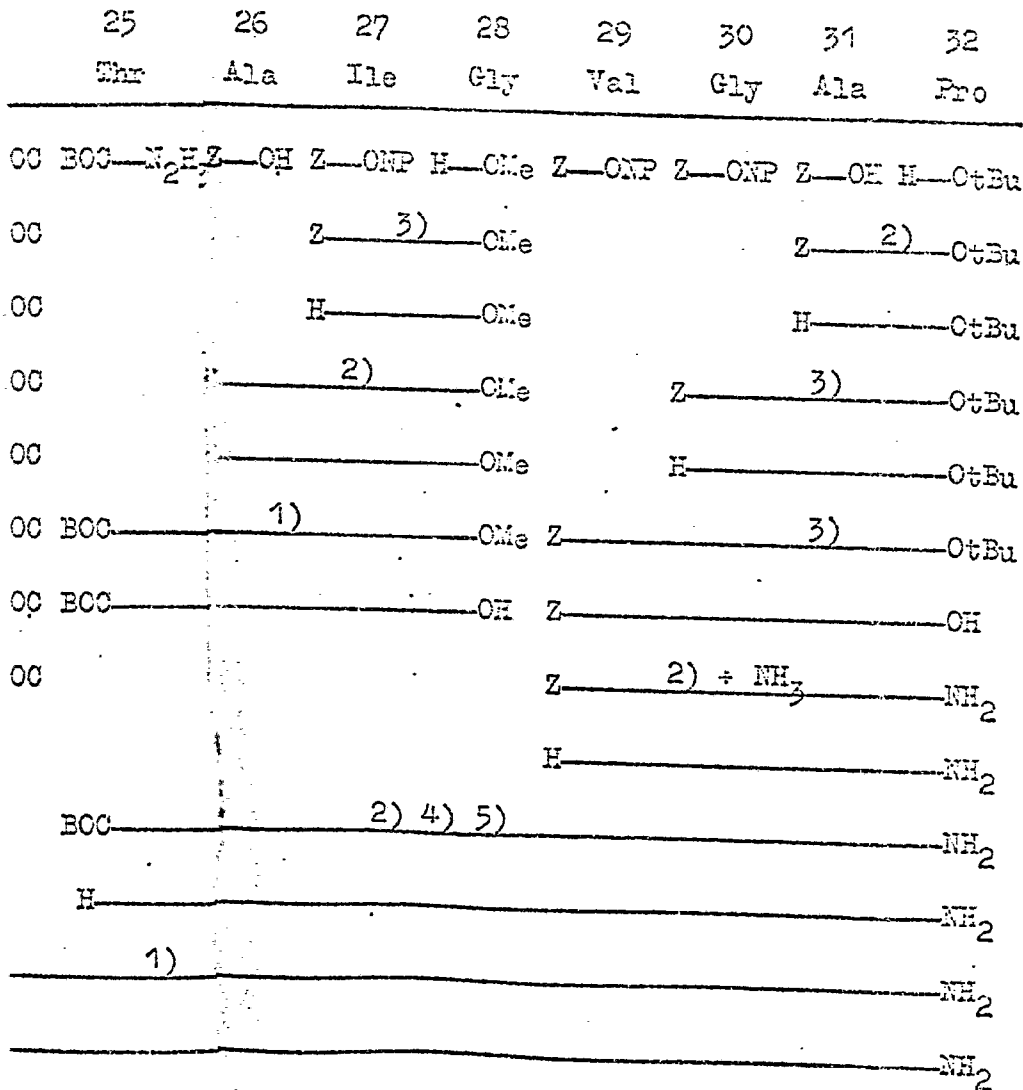


Fig 5

372445



Ejemplo 1

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Nle-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 (Nle⁸-calcitonina M).

5. 500 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Nle-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-
Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-
Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ finamente pulverizada se introducen, agi-
tando intensamente, en 10 cc de ácido clorhídrico concentrado, frío
como el hielo. Después de 10 minutos a 0° se agregan 50 cc de
10. agua y 5 cc de ácido acético glacial y la solución se filtra, para
retirar los iones de cloro, a través de una columna de intercan-
biador de iones Merck Nr. II, débilmente básico, forma acetato.
Después se evapora bajo adición de n-octanol en el evaporador ro-
tativo hasta sequedad, el residuo se lava varias veces bajo decan-
15. tación para retirar el octanol, se seca, se disuelve en ácido
fórmico 0,1-N y para su limpieza se cromatografía en una columna
(3,8 cm; 120 cm) de Bio-Gel P₆. Se recogen fracciones de cada vez
10 cc. Se comprueba su pureza mediante cromatografía de capa del-
gada en óxido de aluminio (sistemas 52, 79 y 45); las fracciones
20. unitarias se reúnen y se liofilizan. En el cromatograma de capa
delgada en gel de sílice es el Rf₆ = 0,44; en óxido de aluminio
es el Rf₅₂ = 0,55; Rf₇₉ = 0,64; Rf₄₅ = 0,45.
El producto de partida se puede preparar como sigue:

25.

1. Z-Ala-Pro-OtBu

68,85 g de Z-Ala-OH se disuelven en 550 cc de dimetilfor-



372445

5. mamida y después se agregan 43,3 cc de trietilamina. A -15° se agregan 30,8 cc de cloroformiato de etilo y la temperatura se aumenta en el plazo de 10 minutos a -10° . Después se agrega una solución enfriada a -10° de 52,65 g de H-Pro-OtBu en 105 cc de dimetilformamida. Se agita durante 30 minutos a -10° y durante 2,5 horas a 20° , se deja reposar durante la noche en la nevera y después se evapora el disolvente en vacío a 40° . El residuo se recoge en éstar acético acuoso, la solución se lava con ácido clorhídrico 0,1-N, solución de sal común al 10 %, bicarbonato sódico al 5 %

15. y nuevamente con solución de sal común, se seca sobre sulfato sódico y se evapora en vacío hasta sequedad. En la cromatografía de capa delgada sobre gel de sílice es el $Rf_2 = 0,6$.

2. H-Ala-Pro-OtBu, acetato

15. Se disuelven 109 g de Z-Ala-Pro-OtBu en 649 cc de metanol y se hidrogenan en presencia de 4,1 cc de ácido acético glacial y 3,1 g de carbón de paladio (al 10 %). Después de filtrar y evaporar la solución hasta sequedad muestra el producto el $Rf_7 = 0,5$.

3. Z-Gly-Ala-Pro-OtBu

20. Se disuelven 56,75 g de Z-Gly-OH en 675 cc de tetrahydrofurano. Con 47,5 cc de trietilamina y 27 cc de cloroformiato de etilo se forma el anhídrido mixto y éste se hace reaccionar con 74 g de H-Ala-Pro-OtBu, acetato, como bajo 1. El aceite obtenido se frota con éter. El producto funde a $87 - 89^{\circ}$; $[\alpha]_D^{20} = -62,9$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada

25. en gel de sílice es el $Rf_2 = 0,50$.

372445

13



4. H-Gly-Ala-Pro-OtBu

80 g de Z-Gly-Ala-Pro-OtBu se disuelven en 800 cc de metanol y se hidrogena como descrito bajo 2, pero sin ácido acético glacial. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,30$.

5.

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

Se suspenden 54,7 g de H-Gly-Ala-Pro-OtBu en 722 cc de éster acético, se enfría a -10° y se agregan 71,6 g de Z-Val-ONP. La mezcla se agita durante 1 hora a -10° , durante 1 hora a 10° y durante 20 horas a 20° . La mezcla de reacción se lava con ácido clorhídrico 0,1-N, agua de sal, carbonato potásico al 20 % y nuevamente con agua de sal. La capa orgánica se seca y el disolvente se evapora en vacío. El residuo (aceite) se lava con éster acético-hexano. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_2 = 0,4$.

10.

15.

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

Se disuelven 102 g de Z-Val-Gly-Ala-Pro-OtBu en 690 cc de éster acético secado y durante 1,5 horas se deja pasar gas ácido clorhídrico a través de la solución. El disolvente se evapora, el residuo se disuelve de nuevo en éster acético, se agrega hexano y se agita durante 1 hora a -10° . Después se filtra. El producto funde a 111° (descomposición). $[\alpha]_D^{20} = -38,3^{\circ}$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,50$.

20.

372445



7. Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂
Se disuelven 64,4 g de Z-Val-Gly-Ala-Pro-OH en 644 cc de tetrahidrofurano seco, se forma el anhídrido mixto con 18,9 cc de trietilamina y 13,5 cc de cloroformiato de etilo como descrito bajo 1, se agregan entonces 25 cc de amoníaco líquido y la mezcla de reacción se elabora como bajo 1. El producto funde a 208-211°. $[\alpha]_D^{20} = -32,7^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,7$.
10. 8. H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂, sulfato
Se suspenden 27,5 g de Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ en 550 cc de metanol y se hidrogena, después de agregar 3 cc de ácido sulfúrico al 96 %, como descrito bajo 2. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,2$.
15. 9. Z-Ile-Gly-OMe
Se suspenden 84,2 g de H-Gly-OMe y 247 g de Z-Ile-OMP en 2,4 litros de dimetilformamida, se enfría a -10° y se agregan 99 cc de trietilamina. La mezcla de reacción se elabora como descrito bajo 5. El producto cristaliza en éster acético-hexano. P.f. 126-128°. $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ (c = 3 en metanol). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_2 = 0,50$.
20. 10. H-Ile-Gly-OMe, Sulfato
Se disuelven 193 g de Z-Ile-Gly-OMe en 4860 cc de metanol y 30 cc de ácido sulfúrico al 96 %. La hidrogenación se realiza como descrito bajo 2. El producto muestra en el cromatograma de
- 25.

372445

13



capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,56$.

11. Z-Ala-Ile-Gly-OMe

5. Se disuelven 125,3 g de Z-Ala-OH en 1250 cc de dimetilformamida, se forma el anhídrido mixto con 79,3 cc de trietilamina y 55,7 cc de cloroformiato de etilo y se hace reaccionar con una solución de 168 g de H-Ile-Gly-OMe, sulfato, en 835 cc de dimetilformamida y 158,3 cc de trietilamina como descrito bajo 1. La dimetilformamida se retira en vacío hasta un volumen de 100 cc y la solución se vierte en 500 cc de agua. El producto funde a 191,5 - 192,5°. $[\alpha]_D^{20} = -9,2$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_1 = 0,65$.

12. H-Ala-Ile-Gly-OMe, 1/2 H₂SO₄

15. Se suspenden 100 g de Z-Ala-Ile-Gly-OMe en 824 cc de dimetilformamida y 6,66 cc de ácido sulfúrico al 96 % y se hidrogena como descrito bajo 2. El producto muestra el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Of_5 = 0,5$.

13. BOC-Thr-Ala-Ile-Gly-OMe

20. Se disuelven 57,8 g de BOC-Thr-NH-NH₂ en 340 cc de dimetilformamida y se enfría a -20°. A la solución se agregan 250 cc de ácido clorhídrico 1,989-N y después 33,5 cc de iso-amilnitrito. La solución se agita fuertemente durante 10 minutos. Mientras tanto se agregan a una solución enfriada a -10° de 79,1 g de H-Ala-Ile-Gly-OMe en 1500 cc de dimetilformamida 105 cc de trietilamina, se enfría ésta solución a -20° y se agrega la solución

25.

372445

1300



5. de arriba del BOC-Thr-N₃. La mezcla se deja reaccionar durante 70 horas a 0°, después se evapora el disolvente en vacío a 40°, el residuo se recoge en éster acético, la solución se lava con ácido clorhídrico 0,1-N, agua, bicarbonato sódico al 5 % y agua y se seca. Después se retira el éster acético en vacío y el residuo se cristaliza en éster acético-hexano. El producto funde a 187 - 189°. $[\alpha]_D^{20} = -13,2^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el Rf₁ = 0,68.

14. BOC-Thr-Ala-Ile-Gly-NH-NH₂

10. Se disuelven 87 g de éster BOC-tetrapéptido en 870 cc de metanol, la solución se enfría a 0° y se agregan 37,6 cc de hidrato de hidracina. Se agita durante 18 horas a temperatura ambiente y durante 1 hora a 0° y se filtra. El precipitado se recristaliza dos veces en metanol. P.f. 231 - 232,5°. $[\alpha]_D^{20} = -5,9^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el Rf₇ = 0,7.

15. BOC-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

20. Se suspenden 27,1 g de BOC-Thr-Ala-Ile-Gly-NH-NH₂ en 250 cc de dimetilformamida. El azida se prepara como descrito bajo 13 con 59,9 cc de ácido clorhídrico 2,23-N y 9,1 cc de iso-amilnitrito. La solución se agita durante 15 minutos. 24,2 g de H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂, sulfato, se disuelven en 120 cc de dimetilformamida, se enfría a 0° y después se agregan 28 cc de trietilamina. Después de mezclar con la solución ácida se ajusta el pH a 7.

25. La mezcla se deja reaccionar durante 70 horas. El péptido se cris-

372445

13 OCT.



taliza en éster acético-hexano. P.f. 226 - 227,5°. $[\alpha]_D^{20} = -25,6^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,7$.

5. 16. H-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂, trifluoroacetato
- Se disuelven 51 g de BOC-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ en 153 cc de ácido trifluoroacético acuoso al 90 %, la solución se deja reposar durante 1 hora y entonces se agregan 1530 cc de éter seco. El precipitado se separa por filtración y se lava 3 veces con éter. P.f. 221 - 223°. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,5$.
- 10.

15. 17. Z-Pro-Gln-NH-NH-BOC
- Se disuelven 67,23 g de Z-Pro-OH en 670 cc de dimetilformamida y mediante 38,9 cc de trietilamina y 26 cc de cloroformiato de etilo se forma el anhídrido mixto. Con éste se hacen reaccionar 70,2 g de H-Gln-NH-NH-BOC como descrito bajo 1. El residuo se cristaliza en éster acético caliente. P.f. 169 - 171°. $[\alpha]_D^{20} = -41,3^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_1 = 0,45$.

20. 18. H-Pro-Gln-NH-NH-BOC
- Se disuelven 94 g del derivado descrito bajo 17 en 564 cc de dimetilformamida y se hidrogenan como descrito bajo 2, pero sin ácido. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,3$.

372445



19. Z-Phe-Pro-Gln-NH-NH-BOC

Se disuelven 80,4 g de Z-Phe-ONP, 68 g de H-Pro-Gln-NH-NH-BOC y 9,4 cc de ácido acético glacial en 560 cc de dimetilformamida como descrito bajo 5. El producto funde a 107° . $[\alpha]_D^{20} = -35,9^{\circ}$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_1 = 0,7$.

5.

20. H-Phe-Pro-Gln-NH-NH-BOC

Se disuelven 103 g de Z-Phe-Pro-Gln-NH-NH-BOC en 618 cc de dimetilformamida y se hidrogena como descrito bajo 2, pero sin ácido. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_6 = 0,5$.

10.

21. Z-Thr-Phe-Pro-Gln-NH-NH-BOC

Se suspenden 46,1 g de Z-Thr-NH-NH₂ en 550 cc de dimetilformamida y se forma el azida como descrito bajo 13 con 177 cc de ácido clorhídrico 1,958-N en tetrahidrofurano y 24 cc de isoamilnitrito. El azida se copula con 81,4 g de H-Phe-Pro-Gln-NH-NH-BOC disueltos en 1200 cc de dimetilformamida y 48,5 cc de trietilamina. Después de cristalizar en éster acético-hexano funde el producto a $129-134^{\circ}$. $[\alpha]_D^{20} = -34,8$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,85$.

15.

20.

22. H-Thr-Phe-Pro-Gln-NH-NH-BOC

Se disuelven 23,6 g del producto descrito bajo 21 en 188 cc de dimetilformamida y se hidrogena como descrito bajo 2, pero sin

372445



13 OCT

ácido. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_7 = 0,7$.

23. Z-His-Thr-Phe-Pro-Gln-NH-NH-BOC

5. Se disuelven 9,68 g de Z-His-NH-NH₂ en 100 cc de dimetilformamida. El azida se forma con 36,3 cc de ácido clorhídrico 2,67-N en tetrahidrofurano y 4,32 cc de iso-amilnitrito y se copula con 19,32 g de H-Thr-Phe-Pro-Gln-NH-NH-BOC, disueltos en 300 cc de dimetilformamida y 13,8 cc de trietilamina, como descrito bajo 13.

10. La mezcla de reacción se separa por filtración, el filtrado se concentra por evaporación en vacío a 100 cc y se vierte en 1100 cc de éster acético. El producto funde a 95 - 133°. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_6 = 0,7$.

24. Z-His-Thr-Phe-Pro-Gln-NH-NH₂, HCl

15. Se disuelven 114 g de Z-His-Thr-Phe-Pro-Gln-NH-NH-BOC en 57 cc de ácido trifluoroacético al 90 %, la solución se deja reposar durante 1 hora y después se agregan 9,8 cc de ácido clorhídrico 4-N. La solución se vierte en 570 cc de éter seco y el residuo se seca en vacío sobre hidróxido potásico. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 =$

20. 0,25.

25. Z-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

25. Se disuelven 11 g del hidrazida descrito bajo 24 en 47 cc de dimetilformamida y se forma el azida con 15,6 cc de ácido clorhídrico 2,267-N en tetrahidrofurano y 1,57 cc de amilnitrito como descrito bajo 13. El azida se deja reaccionar con 6 g del amida

372445



5. del octapéptido descrito bajo 16, disueltos en 70 cc de dimetilformamida y 5,5 cc de trietilamina. El pH es de 6,5. Después de 7 días se filtra la mezcla de reacción, el filtrado se vierte en 710 cc de éster acético y el residuo se agita dos veces con éster acético. El producto funde a 186° bajo descomposición. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,6$.

26. Z-Lys(BOC)-Phe-OBzl

10. Se suspenden 261,6 g de Z-Lys(BOC)-OH, sal dicitclohexilamónica en 6,4 litros de acetonitrilo, se agregan 137,6 g de H-Phe-OBzl, HCl y la suspensión se agita durante 30 minutos. Después de enfriar a -5° se agregan 96 g de dicitclohexilcarbodiimida. La suspensión se agita durante 20 horas a temperatura ambiente, se filtra y el residuo se lava con acetonitrilo. El filtrado se evapora en vacío, el residuo se recoge en éster acético, la solución se lava con ácido clorhídrico 0,1-N, agua, bicarbonato sódico al 5 %
20. y agua, se seca y se evapora. El residuo cristaliza en éster acético-hexano. P.f. 101 - 103°, $[\alpha]_D^{20} = -12,5^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_2 = 0,55$.

27. H-Lys(BOC)-Phe-OH, HCl

25. Se disuelven 105,4 g del éster dipéptido de arriba en 630 cc de dimetilformamida y se hidrogena como descrito bajo 2, pero no se agrega ningún ácido acético glacial, sino, después de 2 1/2 horas, 150 cc de ácido clorhídrico 1,15-N en tetrahidrofurano. La hidrogenación dura 20 horas. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Pf_4 = 0,7$.

372445



13 Oct. 1969

28. Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-OH

5. Se disuelven 76,2 g de Z-Asn-ONP y 73,6 g de H-Lys(BOC)-Phe-OH, HCl en 850 cc de dimetilformamida y 150 cc de tetrahydrofurano, se enfría a -10° y se agregan 47,8 cc de trietilamina como descrito bajo 5. Después de 20 horas a 20° se concentra a 320 cc y el concentrado se vierte en 1435 cc de éster acético y 359 cc de ácido clorhídrico 0,1-N. El precipitado se lava con agua y éter. P.f. $167 - 168^{\circ}$. $[\alpha]_D^{20} = -11,7^{\circ}$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_{\gamma} = 0,7$.

10.

29. H-Asn-Lys(BOC)-Phe-OH, HCl

15. Se disuelven 34 g del producto de arriba en 240 cc de metanol y se hidrogena como descrito bajo 27, pero agregando 13,3 cc de ácido clorhídrico 2-N en tetrahydrofurano, después de 2 1/2 horas, y después otros 13,3 cc de ácido clorhídrico 2-N en tetrahydrofurano después de 20 horas. La solución se sigue elaborando directamente. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_{\gamma} = 0,6$.

30. Z-Asp(OtBu)-Phe-OMe

20. Se disuelven 100,84 g de Z-Asp(OtBu)-OH, sal dicitclohexilamónica en 880 cc de cloruro metilénico, se agregan 43,16 g de H-Phe-OMe, HCl y se sigue agitando aún durante 10 minutos. Después se enfría la suspensión a -5° , se agregan 41,2 g de dicitclohexilcarbodiimida en 120 cc de cloruro metilénico y se elabora como descrito bajo 26. El residuo se lava con cloruro metilénico.

25.

372445



El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_1 = 0,9$.

31. Z-Asp(OtBu)-Phe-NH-NH₂

5. Se disuelven 79,2 g del éster dipéptido de arriba en 1320 cc de metanol, la solución se enfría a 0° y se agregan 21,1 cc de hidrato de hidrazina como descrito bajo 14, pero se deja reaccionar sin embargo durante 3 días. El residuo se lava 2 veces con agua. P.f. 143 - 145°. $[\alpha]_D^{20} = -22,2^{\circ}$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_1 = 0,65$.

10.

32. Z-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-OH

15. Se disuelven 54,4 g de Z-Asp(OtBu)-Phe-NH-NH₂ en 325 cc de dimetilformamida y se prepara el azida como descrito bajo 13 con 111 cc de ácido clorhídrico 1,98-N en tetrahidrofurano y 14 cc de iso-amilnitrito. Se disuelven 53,4 g de H-Asn-Lys(BOC)-Phe-OH, HCl en 280 cc de dimetilformamida y 50 cc de trietilamina, se enfría a -10° y se agrega la solución azida. El derivado pentapéptido se precipita mezclando el residuo con éster acético y el precipitado se lava con agua-etanol (15:1). P.f. 189 - 190°. $[\alpha]_D^{20} = -21,8^{\circ}$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_6 = 0,77$.

20.

33. H-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-OH

Se disuelven 9,6 g del pentapéptido protegido, obtenido bajo 32, en 192 cc de dimetilformamida y se hidrogena como descrito

372445



1969

bajo 27, pero con 4,43 cc de ácido clorhídrico 2,3-N en tetrahidrofurano. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,8$.

34. BOC-Tyr-Thr-ONB

5. Se suspenden 69,68 h de H-Thr-ONB, HCl en 480 cc de acetonitrilo, se agregan 32,84 cc de trietilamina, se enfría a -5° y se agregan 67,52 g de BOC-Tyr-OH y 960 cc de acetonitrilo frío y después 49,44 g de dicitclohexilcarbodiimida. La suspensión se agita durante 1 hora a 3° y se elabora como descrito bajo 26. El derivado dipéptido se aísla como aceite. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_1 = 0,60$.

35. H-Tyr-Thr-ONB, HCl

15. Se disuelven 121 g de BOC-Tyr-Thr-ONB en 1537 cc de cloruro metilénico y 384 cc de nitrometano y se procede como descrito bajo 6. Después de pasar gas HCl durante 45 minutos se agita la suspensión durante 1 hora y después se filtra. El producto funde a $226 - 227^{\circ}$. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_1 = 0,35$.

36. Z-Thr-Tyr-Thr-ONB

20. Se suspenden 57,4 g de Z-Thr-NH-NH₂ en 320 cc de dimetilformamida y se forma el azida con 220 cc de ácido clorhídrico 1,953-N en tetrahidrofurano y 29 cc de iso-amilnitrito como descrito bajo 13. La solución azida se vierte a una solución de 98 g H-Tyr-Thr-ONB, HCl en 760 cc de dimetilformamida y 91 cc de tri-

372445



etilamina. El derivado tripéptido cristaliza en éster acético-hexano. P.f. 111 - 118°. $[\alpha]_D^{20} = -4,4^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_1 = 0,6$.

5.

37. Z-Thr-Tyr-Thr-NH-NH₂

Se disuelven 114,2 g del éster tripéptido de arriba en 480 cc de metanol y como descrito bajo 14 se agregan 48 cc de hidrato de hidrazina. Después de 4 horas se agregan 1440 cc de éster acético y después de otras 1 1/2 horas se filtra la suspensión. El residuo se agita durante 20 horas en 1 litro de éster acético. El producto funde a 219 - 221°. $[\alpha]_D^{20} = -6,6^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_6 = 0,85$.

10.

38. Z-Thr-Tyr-Thr-Gln-NH-NH-BOC

Se suspenden 89 g de Z-Thr-Tyr-Thr-Gln-NH-NH₂ en 890 cc de dimetilformamida y se forma el azida como descrito bajo 13 con 197 cc de ácido clorhídrico 2,02-N en tetrahidrofurano y 26,8 cc de iso-amlnitrito. La solución azida se vierte a una solución enfriada a -10° de 39,3 g de H-Gln-NH-NH-BOC y 56,2 cc de trietilamina en 750 cc de dimetilformamida. Después de 4 días se agregan 720 cc de metanol y 720 cc de éter a la mezcla de reacción y la suspensión se agita durante 2 horas. Después se separan los cristales por filtración y se agitan con 400 cc de ácido clorhídrico 0,05-N (2x). El producto funde a 216-218°. $[\alpha]_D^{20} = -8,3^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_{10} = 0,8$.

15.

20.

25.

372445

18



39. Z-Thr-Tyr-Thr-Gln-NH-NH₂

5. Se disuelven 53,5 g del derivado descrito bajo 38 en 110 cc de ácido trifluoroacético al 90 %, se agita durante 1 1/2 horas y después se agregan 880 cc de éter como descrito bajo 16. El precipitado se agita con 200 cc de metanol-éter (1:4) (2x). El producto funde a 200-203°. $[\alpha]_D^{20} = -4,6^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_5 = 0,75$.

40. Z-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-OH

10. Se suspenden 9,5 g de Z-Thr-Tyr-Thr-Gln-NH-NH₂ en 95 cc de dimetilformamida y se forma el azida, como descrito bajo 13, con 11,94 cc de ácido clorhídrico 2,122-N en tetrahidrofurano y 2,28 cc de iso-amilnitrito. 8,6 g de H-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-OH se disuelven en 210 cc de dimetilformamida y 7,5 cc de trietilamina. Esta solución se enfría a -10° y se agrega a la solución azida. Se deja reaccionar durante 3 días a 0°, después se filtra, el filtrado se evapora y el residuo se agita con 300 cc de ácido clorhídrico 0,1-N. El producto cristaliza en dimetilformamida ácido clorhídrico 0,1-N (1:3,5). Funde a 206°. $[\alpha]_D^{20} = -19,3^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_5 = 0,87$.

15.

20.

41. H-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

25. Se disuelven 32 g del amida BOC-tridecapéptido, descrito bajo 25, en 1200 cc de dimetilformamida y 12 cc de ácido clorhídrico 4-N y se hidrogena como descrito bajo 2 durante 20 horas. El

372445

18



5. filtrado se concentra a 250 cc y se agita con 1500 cc de éter seco. El producto en bruto se limpia mediante distribución de contracorriente según Craig en el sistema n-butanol-ácido acético glacial-agua (4:1:5). $K = 0,11$. El producto muestra $[\alpha]_D^{20} = -39,4^\circ$ ($c = 1$ en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_6 = 0,2$.

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

10. Se disuelven 7,3 g del nonapéptido protegido descrito bajo 40 en 75 cc de dimetilformamida, se agregan 1,33 g de N-hidroxi-succinimida y la solución se enfría a -22° . Se agrega una solución asimismo enfriada de 1,195 g de dicitclohexilcarbodiimida en 15 cc de dimetilformamida (solución A). Después de haber agitado durante 1 hora a -22° y durante 5 horas a $+4^\circ$, se enfría la suspensión de nuevo a -22° . Se vierte ahora a la solución A una solución enfriada y llevada con trietilamina a un pH de 6,7 hasta 7 de 6,9 g del amida tridecapéptido descrito bajo 41 en 80 cc de dimetilformamida. Después de un periodo de reacción de 14 días se vierte la suspensión a una nueva solución A, preparada de 0,73 g del nonapéptido descrito bajo 40. Se deja reaccionar durante otros 7 días a 0° , se filtra entonces la suspensión y el filtrado se evapora en vacío hasta sequedad. El residuo se limpia mediante cromatografía de columna en gel de sílice en el sistema n-butanol-ácido acético glacial-agua (4:1:5). El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,32$.

15.

20.

25.

372445

13 06



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

5. Se disuelven 2 g del producto descrito bajo 42 en 150 cc de dimetilformamida y se hidrogena. Después de 2 1/2 horas se agregan 0,3 cc de ácido clorhídrico 4,844-N. Después de 21 horas se filtra y el filtrado se evapora. El residuo se disuelve en 25 cc de dimetilformamida, se agregan 0,73 cc de ácido clorhídrico 1,0-N, se mezcla con 40 cc de éster acético y se enfría a 0°.

10. Después de separar el precipitado por filtración se le recoge en terc.-butanol-agua y se liofiliza. El producto muestra $[\alpha]_D^{20} = -25,2^{\circ}$ (c = 2 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_6 = 0,32$.

44. BOC-Ser-Thr-OBzl

15. A una solución de 73,8 g de BOC-Ser-OH, sal dicitclohexilamónica, 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 entonces se enfría a -5°. A ésta temperatura se gotea una solución de 40,1 g de dicitclohexilcarbodiimida en 90 cc de cloruro metilénico. Se agita durante 3

20. horas a -5° y durante toda la noche a temperatura ambiente. Después de separar por filtración la dicitclohexilúrea y el hidrocloreuro de la dicitclohexilamina se agita la solución, y ésto tres veces con ácido clorhídrico 0,1-N, dos veces con solución de sal común al 20 %, una vez con solución de bicarbonato sódico al 10 % y dos veces con solución de sal común al 20 % y se seca sobre sulfato sódico. La solución se concentra a aproximadamente

25.

372445



13 OCT 1969

600 cc, se enfría a 5° y se separa por filtración de la ulterior dicitclohexilúrea. Después de evaporar hasta sequedad se cristaliza el residuo, para su limpieza, en éster acético-hexano.

P.f. 110 - 111°; $[\alpha]_D^{20} = -8,5^{\circ}$ (c = 2 en dimetilformamida); Rf₂ = 0,33 (en gel de sílice).

5.

45. 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 1 hora y se deja reposar durante la noche a -10°. El precipitado formado se separa por filtración y se lava tres veces con éter seco y se seca en vacío sobre sosa cáustica; P.f. 128-129°; Rf₇ = 0,65; Rf₄ = 0,50 (en gel de sílice).

10.

46. 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 trietilemina 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 ésto dos veces con agua, dos veces con ácido clorhídrico 0,1-N, dos veces con solución de sal común al 10 %, ocho veces con solución de carbonato potásico al 20 %, dos veces con solución de sal común al 10 % y una vez con solución de sal común al 30 %. Después de secar sobre sulfato sódico se concentra la solución a aproximada-

15.

20.

25.

372445



mente 1,4 litros. Durante la noche en la nevera cristaliza el tripéptido protegido del P.f. 114-116°; $[\alpha]_D^{20} = -14^{\circ}$ (c = 2 en dimetilformamida); $Rf_2 = 0,25$ (en gel de sílice).

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

5.

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 agregan bajo agitación éter seco (925 cc), se agita durante 1 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.

48. BOC-Asn-Leu-Ser-Thr-OBzl

15.

20,8 g de BOC-Asn-OH se suspenden en 208 cc de acetonitrilo, se mezcla con 22,7 g de reactivo de Woodward K 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 ésta 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. La mezcla de reacción, que pronto solidifica, 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,

20.

25.

372445



13 OCT. 1954

hasta que esté libre de cloruro. El producto obtenido se cristaliza en 370 cc de dimetilformamida, 3,7 cc de ácido acético glacial y 370 cc de acetonitrilo. P.f. 225 - 226°; $[\alpha]_D = -36^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida); $Rf_6 = 0,85$ (en gel de sílice).

5.

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

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°. Después se concentra la solución a unos 40 cc, bajo agitación se mezcla con 400 cc de éter y se agita bajo reflujo durante 20 minutos a 35°. Después se enfría la suspensión cristalina a -10° y se deja reposar durante la noche a -10°. El precipitado se separa por filtración, se lava tres veces con éter y se seca en vacío sobre sosa cáustica. P.f. 125 - 127°; $Rf_4 = 0,33$ (en gel de sílice).

10.

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

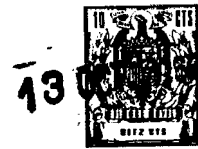
15.

26,3 g de H-Asn-Leu-Ser-Thr-OBzl, TFA se disuelven en 100 cc de dimetilformamida, enfriados a 0°, consecutivamente se mezclan 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 dos días. Después se agregan bajo agitación 300 cc de éster acético y se deja reposar durante la noche a -10°. El precipitado se separa por filtración, se lava dos veces con éster acético y dos veces con éter, se agita durante 1/2 hora con 200 cc de agua, se separa por filtración, se lava con agua y se seca en vacío. P.f. 227 - 228°; $[\alpha]_D = -23^\circ$ (c = 2 en dime-

20.

25.

372445



tilformamida); $Rf_9 = 0,50$ (en gel de sílice).

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

5. 17,0 g de BOC-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-OBzl se disuelven en 340 cc de dimetilformamida bajo calentamiento. 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 en alto vacío. Frotando tres veces con éter se obtiene un pentapéptido unitario según el cromatograma de capa delgada. P.f. 181 - 183°; $[\alpha]_D = -16,5^{\circ}$ (c = 2 en dimetilformamida); $Rf_7 = 0,65$ (en gel de sílice).

52. 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 disolución. Después se enfría la solución a 0°, se vierten 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 1 hora a -22°, después se deja subir lentamente la temperatura interior y se agita aún durante 3 días a temperatura ambiente, se separa por filtración de la dicitclohexilúrea precipitada y se evapora en vacío hasta sequedad. El residuo se agita con una mezcla de éster acético y solución de ácido cítrico al 20. 5 %, el precipitado se separa por filtración, se lava con agua, 25.

372445

13 OCT.



se seca en vacío, se agita con éter seco, se filtra 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).

53. 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 dos 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°. $Rf_6 = 0,63$
10. (en gel de sílice).

54. 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 gotea, bajo agitación, tanta trietilamina hasta que la mezcla de reacción, sobre papel indicador húmedo, señale 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 de ácido cítrico al 5 %, se separa por filtración, se seca en vacío y se cristaliza en dimetilformamida-éster acético. P.f. 191 - 193°; $[\alpha]_D = -31,5^\circ$ (c = 2 en dimetilformamida); $Rf_8 = 0,35$ (en gel de sílice).
- 20.

372445



55. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-N₂H₃
 6 g de BOC-Cys(Bzl)-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-N₂H₂-2
 se disuelven a -40° en 700 cc de amoniaco líquido seco. Bajo agita-
 ción se agregan, al punto de ebullición del amoniaco, 973 mg de
 sodio de manera que el color de la mezcla de reacción se vuelva
 solamente azul claro. Después de 25 minutos ha terminado la reduc-
 ción. Se agita aún durante 10 minutos manteniendo el coloreamiento
 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 1 hora a 0°, el precipitado se separa por
 filtración, se lava dos veces con 10 cc de solución ácido acética
 al 1 % y una vez con 10 cc de éster acético y se seca en alto va-
 cío. Rf₅ = 0,65 (en gel de sílice).

56. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-N₂H₃
 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 de
 hidróxido potásico 0,43-N se ajusta el pH de la solución a 6,8.
 Manteniendo éste pH se gotean en el plazo de 90 minutos, bajo agi-
 tación, simultaneamente 247 cc de una solución de ferricianuro-
 potásico 0,01-m y 4,9 cc de una solución de hidróxido potásico
 0,43-N. Se agita aún durante 90 minutos a temperatura ambiente,
 después, con 0,7 cc de ácido acético glacial, se ajusta el pH de la
 solución a 4,0. Después se agita la solución con 50 cc de Dowex-
 2-X8, forma acetato, a continuación con 13 cc de Dowex-50W-X8,
 forma H⁺, se filtra y se evapora hasta sequedad. El residuo se

372445



disuelve en t-butanol al 50 %, se licfiliza y se seca en alto vacío. El producto contiene aproximadamente un 15 % de acetato potásico. Es unitario en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice: $Rf_5 = 0,63$; $Rf_6 = 0,70$; $Rf_7 = 0,75$.

5. 57. H-Leu-Gly-OEt, HCl
Se disuelven 14 g de Z-Leu-Gly-OEt (obtenido 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 de ácido clorhídrico 6,9-N en etanol y se hidrogena en presencia de 2,8 g de carbón de paladio (10 % de Pd). Después de 1 hora se separa por filtración en vacío del catalizador y, en vacío, se evapora a 40° de temperatura del baño. El residuo es un aceite y se sigue elaborando directamente. $Rf_1 = 0,50$ (en gel de sílice).
- 10.
15. 58. BOC-Nle-Leu-Gly-OEt
De 4,63 g de BOC-Nle-OH, 2,82 cc de trietilamina y 1,9 cc de cloroformiato de etilo en 50 cc de tetrahidrofurano se prepara el anhídrido mixto como descrito bajo 1 y se copula con 5,05 g de H-Leu-Gly-OEt, HCl en 50 cc de tetrahidrofurano. El residuo se cristaliza en éster acético-éter de petróleo (40:60). P.f. 126 - 127°. $[\alpha]_D^{20} = -28,3^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_1 = 0,7$.
- 20.
25. 59. BOC-Nle-Leu-Gly-OH
Se disuelven 3,25 g del éster descrito bajo 58 en 100 cc de metanol y se agregan 21 cc de hidróxido sódico 0,53-N. Después

372445



de agitar durante 1 1/2 horas se acidifica la solución y se evapora en vacío. El residuo se disuelve en agua y se extrae con éster acético. La capa orgánica se seca y se evapora. El producto funde a 71-72°. $[\alpha]_D^{20} = -28,4^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida).

5. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,75$.

60. H-Nle-Leu-Gly-OH

Se disuelven 2,42 g de BOC-Nle-Leu-Gly-OH en 24 cc de ácido trifluoroacético al 90 % como descrito bajo 16. Después de 1 hora se evapora la solución. El producto funde a 94-96°. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,56$.

10.

61. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Nle-Gly-OH

Se disuelven 1 g del hidrazida descrito bajo 56 en 35 cc de dimetilformamida y se forma el azida como descrito bajo 13 con 0,85 cc de ácido clorhídrico 3,64-N en tetrahidrofurano y 0,155 cc de iso-amilnitrito. La solución azida se vierte a una solución de 0,955 g de H-Nle-Leu-Gly-OH y 0,324 g de trietilamina en 25 cc de dimetilformamida. La mezcla de reacción se evapora y se agita 2 veces con éster acético-solución de ácido cítrico. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,71$.

15.

20.

62. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Nle-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

Se disuelven 440 mg del BOC-decapéptido descrito bajo 61

372445



5. y 109 mg de N-hidroxisuccinimida en 35 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -22° , se agregan 98 mg de dicitclohexilcarbodiimida y se agita aún durante 1 1/2 horas a -22° y 3 1/2 horas a 0° . Después se vuelve a enfriar a -22° y se agregan 850 mg de la amida docosapéptido descrita bajo 43 y el pH se ajusta con trietilamina a 6,6. Después de 7 días a 0° y 5 días a 22° se evapora la solución en vacío hasta sequedad y el residuo se cromatografía sobre gel de sílice en el sistema n-butanol-ácido acético glacial-agua (4:1:5). El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,29$.
- 10.

Ejemplo 2

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-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 (Val⁸-calcitonina M).

15. 70 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ se disuelven en 3 cc de ácido trifluoroacético al 95 %, frío como el hielo, y la solución se calienta a 25° . Después de 1 hora a 25° se vierte en 70 cc de éter frío como el hielo y el precipitado obtenido se filtra en vacío. Se lava varias veces con éter, se seca y después se disuelve en ácido acético al 5 %. Para retirar los iones de trifluoroacetato se filtra a través de una columna de intercambiadores de iones Merck Nr. II (debilmente básico, forma acetato). El eluado se liofiliza.
- 20.

372445



El dotriacontapéptido así obtenido no es totalmente unitario según el cromatograma de capa delgada (placas de óxido de aluminio, sistemas 52 y 45). Se puede limpiar por distribución de contracorriente en el sistema n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5).

5. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_6 = 0,45$; en óxido de aluminio es el $Rf_{52} = 0,53$; $Rf_{45} = 0,42$.

El producto de partida se puede preparar como sigue:

1. BOC-Val-Leu-Gly-OEt

10. Se disuelven 4,35 g de BOC-Val-OH en 50 cc de tetrahydrofurano y se forma el anhídrido mixto como descrito en el ejemplo 1, bajo 58 y se copula con 5,06 g de H-Leu-Gly-OEt (ejemplo 1, 57). El producto funde a $112 - 113^{\circ}$. $[\alpha]_D^{20} = -27,3^{\circ}$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_1 = 0,7$.

15. 2. BOC-Val-Leu-Gly-OH

Se saponifica el BOC-Val-Leu-Gly-OEt en igual forma como descrito en el ejemplo 1 bajo 59. El producto funde a 78° . $[\alpha]_D^{20} = -24,7^{\circ}$ (c = 1 en dimetilformamida). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,71$.

20. 3. H-Val-Leu-Gly-OH

Se disuelven 2,9 g de BOC-Val-Leu-Gly-OH en 24 cc de ácido trifluoroacético al 90 %, como descrito en el ejemplo 1 bajo 60. El producto funde a 75° . En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $Rf_7 = 0,5$.

372445



4. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-OH

1 g del hidrazida descrito en el ejemplo 1 bajo 56 se transforma en el azida como descrito en el ejemplo 1 bajo 61 y éste se condensa con 0,933 g de H-Val-Leu-Gly-OH. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,71$.

5.

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

10.

440 mg del amida docosapéptido descrito en el ejemplo 1 bajo 43 se condensan en igual forma como descrito en el ejemplo 1 bajo 62 con BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-OH. El producto muestra en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice el $Rf_5 = 0,29$.

Ejemplo 3

15.

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Leu-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 (Leu⁸-calcitonina M).

20.

Se recubre 200 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Leu-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 con 3,5 cc de ácido trifluoroacético al 95 %, frío como el hielo, la mezcla se calienta, después de disolverse totalmente el derivado de péptido, a 30° y la solución se deja reposar durante

372445



1 hora. Después se vierte en 200 cc de éter frío como el hielo. El precipitado fino se filtra en vacío, después de secar se disuelve en vacío sobre hidróxido sódico en ácido acético diluido y para retirar los iones de trifluoracetato se filtra a través de una columna de intercambiadores de iones Merck Nr. II debilmente básico. El eluado se liofiliza. Se obtiene la sal ácido acética de la Leu^B-calcitonina N.

5. El producto de partida se puede obtener como sigue:
400 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Leu-Leu-Gly-OH, 600 mg de H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Cys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂, 100 mg de N-hidroxisuccinimida, 120 mg de dicitclohexilcarbodiimida y 6 cc de dimetilformamida se agitan durante 3 horas a 45°. Después se vierte la mezcla en 300 cc de éter y el precipitado se separa por filtración. El producto en bruto se limpia por distribución en contracorriente en el sistema metanol-tampón-cloroformo-tetraclorocarbono 11:3:6:7; (tampón como en el ejemplo 1); K = 0,7.

10. El decapeptido empleado como producto de partida se prepara como descrito en la solicitud suiza Nr. 11671/69 (Case 6548/1-6) para el correspondiente Met^B-decapeptido. Se parte del H-Leu-Gly-OMe, se reacciona con éster de Z-Leucin-N-hidroxisuccinimida, el Z-Leu-Leu-Gly-OMe obtenido se hidrogena, se condensa en H-Leu-Leu-Gly-OMe, HCl con TRI-Cys(TRI)-OH como descrito bajo 9) en el ejemplo 1 de la solicitud suiza Nr. 11671/69 (Case 6548/1-6) y con el derivado tetrapeptido obtenido se procede análogo a como se describe en la mencionada solicitud bajo 10) hasta 18).

372445



Ejemplo 4

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Nva-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 (Nva^B-calcitonina M).

5. 5 mg de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Nva-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 0,2 cc de ácido trifluoracético al 95 % y se deja reposar durante 1 hora a 30°. Después se agregan 5 cc de éter, el precipitado se separa por centrifugación y se lava con poco éter y se seca. El amida dotriacontapéptido, obtenido como sal ácido trifluoracética, se puede transformar en el acetato mediante intercambiadores de iones. El producto de partida se puede preparar como sigue:
- 10.

15. 1. Z-Nva-Leu-Gly-OMe
Se mezclan 4,3 g de éster de Z-L-Nva-2,4,5-triclorofenilo (J. chem. Soc. (c) 1968, 715) y 2,2 g de H-Leu-Gly-OMe con 15 cc de dimetilformamida y la mezcla de reacción se agita durante 48 horas a 35°. Después se diluye con mucho cloroformo, se enfría en
20. hielo y se agita tres veces con solución fría como el hielo de carbonato potásico al 5 % y tres veces con hielo-agua. La solución clorofórmica se seca con sulfato sódico y después se evapora hasta sequedad, finalmente a 0,1 mg Hg para retirar la dimetilformamida residual. Después se disuelve el residuo en cloroformo
25. y se cromatografía en una columna de gel de sílice preparada en

372445



1963

5. cloroformo, empleandose para la elución un cloroformo-cloroformo + metanol (1:1) (cada vez 1 litro), graduado linealmente. Se recogen fracciones de 100 cc, se evaporan hasta sequedad y se comprueba la pureza del residuo mediante cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice y se reúnen las fracciones puras. El producto muestra en tolueno-acetona (1:1) el $R_f = 0,4$.
2. H-Nva-Leu-Gly-OMe
1,7 g de tripéptido de arriba se disuelven en metanol y agitando intensamente se hidrogena en presencia de 400 mg de carbón de paladio (10 % Pd). Terminada la recepción de hidrógeno se separa por filtración del catalizador y el eluado se evapora hasta sequedad. Se obtiene una resina incolora que se emplea directamente para la ulterior reacción.
- 10.
3. TRI-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OMe
Se mezclan 2,5 g de TRI-Cys(TRI)-OH y 1,1 g del H-Nva-Leu-Gly-OMe de arriba con 40 cc de acetonitrilo y se agregan entonces, bajo agitación, 1,3 g de dicitclohexilcarbodiimida. Después de agitar durante 20 horas a 27° se filtra en vacío del producto precipitado y éste se extrae con 1 litro de cloroformo, entonces se evapora el eluado hasta sequedad y el residuo se frota con éter de petróleo. Después de verter la solución éter de petróleo se seca el producto insoluble y para su limpieza se disuelve y precipita en 3 cc de éter de petróleo. Se obtiene el derivado tetrapéptido como polvo amorfo, sólido. En la cromatografía de capa delgada muestra sobre placas de gel de sílice el $R_f = 0,62$ en cloro-
- 15.
- 20.
- 25.

372445



formo-metanol (98:2).

4. H-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OMe

980 mg de TRI-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OMe se disuelven a 30° en 25 cc de ácido acético al 75 % y se deja reposar durante 1 hora. Después se evapora hasta sequedad y el residuo se frota varias veces con éter. El acetato insoluble en éter del H-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OMe se seca en vacío a 35° y se elabora directamente.

5. DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OMe

Se disuelven 750 mg de DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-NHNH₂ en 6 cc de dimetilformamida, se enfría a -20° y se agregan 3,5 cc de ácido clorhídrico 1-N en éster acético. Se agregan entonces 0,16 cc de t-butilnitrito y la mezcla de reacción se deja reposar durante 15 minutos a -10°. Después se agrega la solución enfriada a -10° de 500 mg de H-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OMe en 4 cc de dimetilformamida y 0,7 cc de trietilamina y se deja reposar durante 30 minutos a -10° y durante 18 horas a 0°. Después se evapora en alto vacío a una temperatura del baño de 40° a un volumen de aproximadamente 5 cc y el producto se precipita mediante adición de agua de hielo. Después de frotar a fondo se filtra en vacío, se lava con agua de hielo y el derivado hexapéptido en bruto se seca en el secador sobre cloruro de calcio. Para la limpieza se disuelve y precipita tres veces de éster acético-ciclohexano. El producto muestra en la cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de sílice el Rf = 0,47 en tolueno-acetona (7:3).

372445



1964

6. H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OH

5. Se disuelven 430 mg de DPC-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OMe en 10 cc de ácido acético al 80 %, se deja reposar durante 7 horas a 28°, se evapora en el evaporador de rotación a 35° de temperatura del baño hasta sequedad, se seca durante 3 horas a 35° y 0,01 Torr, se disuelve entonces en 30 cc de metanol, se agregan 3 cc de lejía sódica 1,0-N, se agita durante 1 hora a 28°, se agregan entonces 2 cc de ácido acético glacial y se evapora en el evaporador rotativo a 35° de temperatura del baño hasta sequedad. Se frota el residuo con agua de hielo ajustandose el pH a 6-7, se filtra en vacío, se lava ulteriormente con agua de hielo y se seca en el secador sobre cloruro de calcio.

10.

7. BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OH

15. Se mezclan 270 mg de BOC-Cys(TRI)-Gly-Asn-Leu-NH-NH₂ con 4 cc de dimetilformamida, se enfría a -20° y se agregan 1,2 cc de ácido clorhídrico 1-N en éster acético. Se agregan entonces 0,044 cc de t-butilnitrito y se deja reposar durante 15 minutos a -10°. Después se agrega una solución enfriada a -10° de 230 mg de H-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys(TRI)-Nva-Leu-Gly-OH en 4 cc de dimetilformamida, 1 cc de agua y 0,25 cc de trietilamina. Se deja reposar durante 18 horas a 0°, se evapora entonces a 0,01 Torr y 35° de temperatura del baño a un pequeño volumen y el decapeptido se precipita mediante adición de agua. El precipitado se frota, se filtra en vacío, se seca sobre cloruro de calcio en el secador. El polvo se suspende en 7 cc de metanol a 0°, se frota a fondo y entonces se filtra en vacío.

20.

25.

372445



8. BCC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Nva-Leu-Gly-OH
Se disuelven 105 mg del decapeptido obtenido bajo 7) en 20 cc de dimetilformamida y esta solución se gotea, en el transcurso de 1 hora, a la solución fuertemente agitada de 150 mg de yodo en 100 cc de metanol. Se sigue agitando durante 1 hora, se decolora entonces a 0° mediante adición de solución de tiosulfato sódico 1-N, se evapora entonces en el evaporador rotativo a un volumen de aproximadamente 20 cc y se precipita mediante adición de 300 cc de éter. Se filtra en vacío, se seca en vacío a 30° y después se frota el polvo con agua. Se filtra en vacío, y se seca en el secador sobre cloruro de calcio.
- 5.
- 10.
9. 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 a la solución clara se agregan 11,8 cc de trietilamina. La suspensión formada se agita durante 20 horas a temperatura ambiente con lo que se tiñe amarillo oscuro. A continuación se concentra en vacío a unos 100 cc y se agita en 1 litro de éster acético/cloroformo (4:1) 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 agujas incoloras del P.f. 74,5 - 76,5°. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el Rf en el sistema cloroformo-metanol (95:5) = 0,74 en cloroformo-acetona (75:25) = 0,65.
- 15.
- 20.
- 25.

372445



13 Oct. 1958

10. H-Asp(tBu)-Phe-OCH₃
48,6 g de Z-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ se descarboxilizan a temperatura ambiente 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 al 10 % sobre carbón. Terminada la recepción de hidrógeno se separa por filtración y se evapora. Se obtienen 38,7 g de una espuma blanca. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en cloroformo-metanol (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.
- 5.
- 10.
11. Z-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃
38,6 g de H-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃, HCl obtenido, se agitan con 42,0 g de Z-Gln-ONF en 170 cc de dimetilformamida a una solución clara, debilmente 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 30-35° de temperatura del baño. Durante éste tiempo se agregan otros 40 cc de dimetilformamida y además aún 1,39 cc de trietilamina.
- 15.
20. Para la elaboración se disuelve el preparado en 4 litros de cloroformo, y en un sistema de aparatos de distribución de contracorriente de 20 etapas (volumen de fascas: fase inferior 400 cc, fase superior 200 cc por recipiente) se lava consecutivamente con 1 litro de solución de ácido cítrico al 5 %, 400 cc de solución de sal común saturada, 6 litros de sosa aproximadamente 2-N y 2,8 litros de solución de sal común saturada. Después de secar y evaporar
25. cristaliza lentamente en la nevera el derivado tripéptido en 1,8 li-

372445



vros de etanol. Se obtiene el Z-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ del P.f. 186-188°.

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

5. en cloroformo-metanol (9:1): Rf = 0,39; en cloroformo-acetona (1:1): Rf = 0,24; Rf_{102E} = 0,69, Rf₈₉ = 0,46, Rf_{43A} = 0,65 λ_{D}^{20} -28° ± 1° (c = 1,3 % en dimetilformamida).

12. H-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

10. 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 se hidrogena en presencia de 2 g de carbón de paladio (10 % Pd). Después de separar por filtración en vacío el catalizador y evaporar se obtiene el H-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃, HCl en forma de una espuma incolora. En el cromatograma de capa delgada en 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; Rf_{102E} = 0,22.

13. Z-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

20. Toda la cantidad del hidrocloreuro de 12 se disuelve junto con 7,4 g de Z-Thr(tBu)-OSU en 14 cc de dimetilformamida, a temperatura ambiente, y a ésta solución, se gotean, bajo enfriamiento en el baño de hielo, 1,72 cc de trietilamina. A continuación se agita la suspensión marronácea durante 20 horas a temperatura ambiente. Después de la elaboración usual en mucho éster acético
25. (cada vez lavando tres veces con ácido cítrico al 5 % y carbonato

372445



sódico aproximadamente 2-N, lavado neutro con solución de sal común saturada, 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 la nevera en 90 cc de etanol. P.f. 155-161°.

5.

En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice se obtuvieron los siguientes valores Rf: en cloroformo-metanol (9:1): Rf = 0,52; en ciclohexano-acetona (3:7): Rf = 0,48; Rf₈₉ = 0,48, Rf_{121A} = 0,76. $[\alpha]_D^{20} = -4^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ (c = 2,3 % en dimetilformamida).

10.

14. H-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃

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

15.

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

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

en cloroformo-metanol (9:1): Rf = 0,17; en acetona Rf = 0,18;

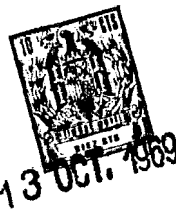
20.

Rf_{102E} = 0,23; Rf₈₉ = 0,12.

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

687 mg de Z-Tyr(tBu)-OH-sal díciclohexilamónica 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-metilmorfolino. A -22° se agregan 0,170 cc de cloro-

25.



372445

- formiato de isobutilo y se agita durante 1/2 hora a -22 hasta -10° . Después se gotea el H-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-OCH₃ arriba descrito, disuelto en 15 cc de tetrahidrofurano y previamente enfriado, y se enjuaga con 5 cc del mismo disolvente. Después de reposar
5. 1/2 hora a -10° se agita aún durante 15 horas a temperatura ambiente. Después se concentra por evaporación en vacío y el éster acético se elabora en la forma usual, (vease 13). 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 metanol en la nevera. Se obtienen agujas gruesas, cortas, que se descomponen al secar en
10. alto vacío a 50° . P.f. $169 - 173^{\circ}$. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf: en cloroformo-metanol (9:1) Rf = 0,46; en cloroformo-metanol (1:1) Rf 0,95; en cloroformo-acetona (1:1) Rf = 0,44; Rf₈₉ = 0,61; Rf_{acetona} = 0,68, Rf_{102E} = 0,73. $[\alpha]_D^{21} = -54^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ (c = 2,0 % en dimetilformamida).
15. 16. 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 en la forma usual a temperatura ambiente con 500 mg de carbón de paladio al 10 %. Se obtiene una
20. espuma incolora que es unitaria en el cromatograma de capa delgada y como tal se sigue empleando. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf: en cloroformo-metanol (95:5) Rf = 0,22; Rf₈₉ = 0,42.

372445



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

5. El producto de 16) 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 (vease 13). 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 amorfo, incoloro, del P.f. 146 - 148°. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf: en cloroformo-metanol (9:1): Rf = 0,55; en cloroformo-acetona (1:1) Rf = 0,60; Rf_{B9} = 0,43; $[\alpha]_D^{21} = + 6 \pm 0,5^{\circ}$ (c = 2,0 en dimetilformamida).

10.

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

15. 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 aísla el producto precipitado y se seca en alto vacío a 60°. Se obtiene el hidrazida microcristalino del P.f. 226-229° (descomposición). En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice se obtienen los siguientes valores Rf: en cloroformo-metanol (9:1) Rf = 0,32; en ciclohexano-acetona (3:7) Rf = 0,23; Rf_{B9} = 0,34. $[\alpha]_D^{20} = + 4^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (c = 1,0 en dimetilformamida).

20.

372445



19. Z-Lys(BOC)-Phe-OMe
25,0 g de Z-Lys(BOC)-ONP y 10,7 g de H-Phe-OMe 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-m y agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora en vacío hasta sequedad. En éster acético-hexano cristaliza el dipéptido protegido del p.f. 78 - 80°.
5. Rf = 0,45 en el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en el sistema cloroformo-acetona (8:2).
20. Z-Lys(BOC)-Phe-NH-NH₂
27 g del éster metílico 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).
- 15.
20. 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 dioxano 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 trietil-
- 25.

372445



amina. En el plazo de 1 hora se deja calentar a 0° ajustándose 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.

5.

22. 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 %. Después de terminar la hidrogenación se separa el catalizador por filtración, el filtrado se evapora hasta sequedad y el residuo se sigue elaborando inmediatamente.

10.

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

5,4 g de H-Lys(BOC)-Phe-His-OMe y 4,5 g de Z-Asn-ONP se agitan en 20 cc de dimetilformamida durante 20 horas a temperatura ambiente. Mediante adición de éster acético se precipita el derivado péptido, se separa por filtración y se lava con éter. Después de recrystalizar en metanol funde el producto a 182-183°. 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 de unos 30° aproximadamente se agregan 2,5 cc de hidrato de hidra-

20.

372445



5. zina y se deja reposar durante 2 horas a temperatura ambiente. Mediante adición de agua se precipita el hidrazida del péptido, se separa por filtración y se lava con agua hasta estar libre de la hidrasina. El producto se recristaliza en etanol, P.f. 200-201°. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice en el $R_f^{430} = 0,5$.

25. H-Phe-Pro-OH

10. Z-Phe-Pro-OH se transforma mediante reducción catalítica (carbón de paladio) en metanol-agua (4:1) en el dipéptido libre. Este se obtiene cristalizado después de concentrar la solución de hidrogenación liberada del catalizador a un pequeño volumen mediante adición de acetona, y ésto como monohidrato del dipéptido del P.f. 125 - 128°.

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

15. 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 untuosa. Esta se disuelve en 500 cc de éster acético y se lava cinco veces, cada una con 100 cc de solución de ácido tártrico al 5 % y a continuación con agua hasta estar neutro. La fase orgánica se concentra por evaporación hasta sequedad y la espuma sólida residual se pulveriza y se seca en alto vacío a 40°. Disolviendo y precipitando dos veces en éster acético-éster de petróleo se obtienen 13,3 g de derivado tripéptido anorfo, cromatográficamente puro, con pun-

20.

25.

372445

13 00



to de fusión inexacto en unos 75 - 85°. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice es el $Rf_{115} = 0,56$; $Rf_{121A} = 0,57$.

27. Z-Ile-Gly-OMe

5.

2,23 g de Z-Ile-OH-sal díciclohexilamónica se suspenden en éster acético y se acidifica con ácido cítrico 0,2-m. La solución éster acética obtenida se lava neutro, se seca y se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en 15 cc de acetonitrilo, a la

10.

solución se le 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 díciclohexilcarbodiimida y se agita durante la noche a 0°.

15.

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 se concentra en vacío a aproximadamente 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 sobre gel de sílice.

20.

28. 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 (10 %). Después de separar por filtración el catalizador se evapora totalmente el disolvente. La espuma obtenida es unitaria en el cromatograma de capa delgada sobre gel

25.

de sílice; $Rf = 0,26$ en cloroformo-metanol (95:5).

372445



13 OCT 1951

29. Z-Ala-Ile-Gly-OMe
2,39 g del hidrocloreuro del éster dipéptido de arriba y 3,78 g de Z-Ala-OMP en 40 cc de dimetilformamida se mezclan bajo agitación con 1,4 cc de trietilamina y la suspensión formada se agita durante la noche a temperatura ambiente. Después de diluir con éster acético se lava con solución de carbonato potásico diluido hasta estar libre de nitrógeno, a continuación se lava aún con ácido cítrico 0,1-m y agua. Una parte del derivado tripéptido se mantiene sin disolver durante la agitación, ésta se separa por filtración. La solución éster acética se evapora totalmente después de secar. El residuo se compone asimismo de un producto puro. P.f. 190-191^o, Rf = 0,5 en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice en el sistema cloroformo-metanol (95:5).
5. 30. H-Ala-Ile-Gly-OMe
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 (10 %). Terminada la hidrogenación se separa por filtración del catalizador y el filtrado se evapora totalmente hasta sequedad. El residuo unitario según el cromatograma de capa delgada se sigue elaborando inmediatamente.
10. 31. Z-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe
1,36 g de H-Ala-Ile-Gly-OMe y 2,5 g de Z-Thr(tBu)-OSU se agitan en 3 cc de dimetilformamida durante 20 horas a temperatura ambiente. El derivado tetrapéptido se precipita con éter, se separa por filtración y se lava con éter. Después de recristalizar en etanol es el P.f. 229-230^o. $[\alpha]_D^{20} = -43^{\circ}$ (c = 1 en metanol).
15. 25.

372445



Rf = 0,55 en el sistema cloroformo-metanol (95:5) en gel de sílice.

5. 32. H-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe
5,66 g del compuesto carbobenzoxi de arriba se disuelven en 400 cc de metanol caliente y se hidrogena en presencia de 1 g de carbón de paladio(al 10%). Después de separar por filtración al catalizador 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) on gel de sílice.
10. 33. Z-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe
4,6 g del H-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe descrito bajo 32) 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 se vuelva sólida. Después de dejar reposar durante la noche se diluye con éter, el precipitado se separa por filtración y se lava con éter 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°.
15. 34. H-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe, HCl
14,4 g del derivado pentapéptido descrito bajo 33) se suspende 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 la recepción de hidrógeno haya terminado y el producto de partida se haya disuelto. Después de separar por filtración el catalizador se evapora el filtrado en
- 20.
- 25.



372445

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.

5. 35. Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OMe
 12,0 del hidrocloreuro del éster metílico del pentapéptido descrito bajo 34) se disuelven en 80 cc de dimetilformamida. Consecutivamente se agregan bajo agitación, 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 trietilamina y 6,2 g de dicitclohexilcarbodiimida. Se agita a 0° hasta que la mezcla se espese, después se deja reposar durante la noche a 0°. Después de concentrar por evaporación en alto vacío 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 aproximadamente 1 litro de isopropanol. Se obtienen 18,2 g del derivado octapéptido protegido. $Rf_{89} = 0,27$ en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice.
- 10.
- 15.
20. 36. Z-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH
 10,9 g del éster metílico octapéptido descrito bajo 35) 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 hasta estar claro y del filtrado se precipita el producto vertiendo en 600 cc de ácido clorhídrico 0,05-N frío
- 25.

372445

13 OCT 1969



como el hielo. El precipitado se separa por filtración y se lava neutro con agua. El producto unitario en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice ($R_{f100} = 0,45$) se puede recristalizar en metanol-agua.

5. 37. 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 36) se disuelven en 100 cc de ácido acético al 80 % y la solución se hidrogena en presencia de 0,5 g de carbón de palladio (10 % Pd). Terminada la recepción de hidrógeno se separa el catalizador por filtración en vacío y la solución se evapora hasta sequedad. La sal ácido acética del derivado octapéptido, obtenida como resina incolora, se seca en alto vacío. En el cromatograma de capa delgada en gel de sílice es el $R_{f100} = 0,21$.
- 10.
15. 38. Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH
11,25 g de Z-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-hidrazida, disuelto 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° se agregan 4,8 cc de trietilamina, después una solución de 9,0 g del producto descrito bajo 37) en 210 cc de dimetilformamida al 90 %. Enfriando fuertemente se mantiene la temperatura a -15° . En el transcurso de 1 hora se calienta a 0° , manteniéndose mediante adición ocasional de trietilamina el pH
- 20.

372445



- en 7 - 8. En total se agregan aún 3,7 cc de trisilexina.
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 vertiendo en 1,5 litros de ácido acético al 1 % se vuelve a precipitar. El producto separado por filtración y lavado dos veces con agua se vuelve a disolver y precipitar en igual forma. $Rf_{100} = 0,33$ (sobre placas de gel de sílice).
- 5.
10. 39. H-Asn-Lys(BOC)-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-OH
1,7 g del dodecapéptido protegido de arriba se disuelven en 100 cc de ácido acético al 50 % y en presencia de 0,5 g de carbón de paladio (10 % Pd) se hidrogena en la forma usual. Después de separar por filtración del catalizador se concentra fuertemente en alto vacío a 30° y el residuo se liofiliza con terc.-butanol. El producto obtenido en rendimiento cuantitativo, unitario en el cromatograma de capa delgada ($Rf_{100} = 0,1$ sobre gel de sílice), se sigue elaborando inmediatamente.
- 15.
20. 40. 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
1,73 g del derivado péptido descrito bajo 18 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. Después se



372445

13 OCT. 1968

- agregan a -15° 0,22 cc de terc.-butilnitrilo y se deja reaccionar durante 15 minutos a -15° . Se vuelve a enfriar a -20° y se agregan 0,53 cc de trietilamina y después una solución de 1,6 g del derivado péptido descrito bajo 39) en 40 cc de dimetilformamida al 90 %.
5. La temperatura se aumenta en el plazo de 1 hora a 0° , manteniéndose mediante adición en porciones de trietilamina el pH en 7 - 8. En total se agregan 0,25 cc de trietilamina. Después de agitar durante otras 15 horas a 0° se precipita el producto vertiéndole en éter, el precipitado se separa por filtración y se lava con éter y agua.
10. Para la limpieza se vuelve a disolver y precipitar una vez en dimetilformamida-éster acético y una vez en dimetilformamida-ácido clorhídrico 0,0-N. El material puro muestra en el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice el $Rf_{100} = 0,40$.

41. 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 éter y el polvo formado se frota a fondo. Después de separar por filtración y secar se obtienen 5,5 g de Z-Ala-Pro-NH₂ del P.f. 167,5-168,5 $^{\circ}$.
20. $[\alpha]_D^{20} = 74^{\circ}$ (c = 1 en metanol).

42. Z-Gly-Ala-Pro-NH₂
- 27,1 g del derivado 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

372445 13 OCT. 1969

5. paladio (al 10 %). Terminada la hidrogenación se evapora la solución a 40°-50° de temperatura del baño en vacío. 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 en el plazo de 45 minutos 11,2 cc de trietilamina absoluta, bajo agitación. Después se agita durante 20 horas a temperatura ambiente. La suspensión se 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
10. capa etérica dos veces, cada una con 300 cc de agua. Las fracciones acuosas se evaporan conjuntamente en vacío a 40-50° y se libera varias veces del agua mediante adición de cloroformo y evaporación. El residuo bien secado se recoge a 40-50° en 500 cc de éster acético, el hidrocloreuro de la trietilamina insoluble se separa
15. por filtración y el filtrado se mezcla a 30-40° con 10 cc de éter con lo que se presenta cristalización. Después de reposar durante unas 20 horas a +5° hasta +10° se aíslan los cristales, se lavan y se secan, P.f. 105-106°. El producto contiene un 3 % de hidrocloreuro de trietilamina. Este se puede seguir reaccionando en ésta forma.
20. 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
25. con 15 cc de cloruro metilénico. Las soluciones cloruro metilénicas reunidas se secan con sulfato sódico anhidro y se evaporan. El residuo se recrystaliza en 50 cc de éster acético. Se obtienen

372445



4,4 g de derivado tripéptido P.f. 109-112°. Después de cristalizar en acetona-metanol-éter (10:4:6) se obtienen cristales del P.f. 144,5-145,5° (polimorfía de cristales).

$$[\alpha]_D^{20} = -93^\circ (c = 1,0 \text{ en metanol})$$

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

43. H-Gly-Ala-Pro-NH₂

10. 18,8 g del derivado de amida tripéptido en bruto, obtenido bajo 42) se disuelven en 400 cc de dimetilformamida y se hidrogena en presencia de 1,0 g de carbón de paladio (10 % Pd). Terminada la hidrogenación se separa por filtración y la solución se emplea en la siguiente etapa después de una breve desgasificación.

44. Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

15. A la solución del amida tripéptido obtenido bajo 43) (550 cc) se agregan 20,1 g de Z-Val-éster-p-nitrofenílico 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 se agita en 210 cc de etanol absoluto 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.

372445



13 OCT. 1964

45. H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂
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 % Pd). Después de terminar la recepción de hidrógeno se separa por filtración del catalizador, la solución se evapora y el residuo se seca en alto vacío a 35° de temperatura del baño. 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).
- 5.
10. 46. 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
300 mg del derivado péptido descrito bajo 40), 500 mg de H-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ y 170 mg de N-hidroxisuccinimida se disuelven en 10 cc de dimetilformamida, en alto vacío se concentra por evaporación 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 aísla. Se limpia mediante distribución según Craig en la mezcla Metanol-tampón (como en el ejemplo 1)-cloroformo-tetraclorocarbono (10:3:5:6), K = 0,29. El producto puro aislado de la distribución muestra en el cromatograma de capa delgada el Rf₁₀₇ = 0,62 (sobre placas de gel de sílice).
- 15.
- 20.
25. 47. 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-

372445



Ala-Pro-NH₂

300 mg del derivado 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 % Pd). Después de la total descarboxilización se separa por filtración el catalizador, el filtrado se concentra fuertemente en alto vacío a 30° y el residuo se licofiliza en terc.-butanol. El residuo se disuelve en 10 cc de metanol, mediante adición de bicarbonato sódico 1-N se pone debilmente alcalino y se precipita goteando en carbonato sódico 0,1-N. El producto aislado se vuelve a disolver y precipitar en igual forma.

5. En el cromatograma de capa delgada sobre gel de sílice en el Rf₁₀₀ = 0,34.

48. BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Nva-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. 23 mg de de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Nva-Leu-Gly-OH, 35 mg de H-Thr(tBu)-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Lys(BOC)-His-Phe-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂, 7 mg de N-hidroxisuccinimida, 8 mg de dicitclohexilcarbodiimida y 0,5 cc de dimetilformamida se agitan durante 4 horas a 45°. Después se agregan 15 cc de éter y el precipitado fino se filtra en vacío. Para la limpieza se distribuye el producto en bruto multiplicativamente a través de 35 escalones en el sistema de disolvente metanol-tampón-cloroformo-tetraclorocarbono (11:3:6:7; tampón como en el ejemplo 1).

20.

25.

372445



13 OCT. 1969

Ejemplo 5

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Abu-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 (Abu⁸-calcitonina M).

5.

Se introducen 1,8 g de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-
Abu-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 finamente pulverizado en 50 cc de ácido clorhídrico
concentrado, frío como el hielo, se agita durante 10 minutos a
0°, se agregan entonces 300 cc de ácido acético al 10 %, frío

10.

como el hielo, y se filtra a través de una columna de intercambia-
dor de iones Merck Nr. II, forma acetato. Después se evapora la
solución en el evaporador rotativo a 40° de temperatura del baño
bajo adición de n-octanol, el residuo de evaporación se lava, para
retirar el n-octanol, con éter de petróleo, se seca a 40°, se
disuelve en agua y se liofiliza. Se obtiene el amida del dotria-
contapéptido como polvo ligero casi incoloro.

15.

El producto de partida se prepara como sigue:

2,0 g de BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Abu-Leu-Gly-
OH, 3,2 g 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 500 mg de N-hidroxisuccinimida se mezclan con
35 cc de dimetilformamida. Después se agrega bajo agitación una
solución de 600 mg de dicitclohexilcarbodiimida en 5 cc de dimetil-
formamida y se agita durante otras 4 horas a 45°. Después se en-

25.

372445



fría a 0° y la masa de reacción se introduce en 600 cc de éter.
 Se deja reposar durante 3 horas a 0°, se filtra entonces en vacío
 y el producto en bruto se seca en vacío a 35°. Para limpiar se mez-
 cla éste con metanol, se filtra en algo de dicitohexilúrea y se
 5. cromatografía en una columna preparada en metanol de Sephadex
 LH-20 (4,8 cm; 120 cm). Se recogen fracciones de 20 cc cada una,
 se evapora hasta sequedad y se evalua la pureza de las fracciones
 mediante cromatografía de capa delgada sobre placas de gel de
 sílice en el sistema 52A y 100. Las fracciones puras se reúnen.

10. El derivado decapeptido empleado como producto de partida
 se puede obtener, por ejemplo, como sigue:

15. Se condensa Z-Abu-OH según el método de anhídrido mixto (anhídri-
 do mixto con cloruro pivaloílico) con H-Leu-Gly-OMe, se hidrogena
 el derivado tripéptido Z-Abu-Leu-Gly-OMe, limpiado después de
 cromatografía en gel de sílice a H-Abu-Leu-Gly-OMe y se procede
 análogo a como descrito para el H-Met-Leu-Gly-OMe en la solici-
 tud suiza Nr. 15147/68 (Case 6548/1-4) en el ejemplo 1 bajo 9)
 hasta 18).

Ejemplo 6

20. $\overline{\text{H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Gly-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Gly-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH}_2}$ (Gly^{12,18}-calcitonina M).

25. Se disuelven 500 mg de $\overline{\text{BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly-Thr(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Gly-Phe}}$

372445

13 OCT 1968



5. His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂ en 7 cc de ácido trifluoroacético al 95 %, frío como el hielo, se calienta a 30° y se deja reposar durante 1 hora. Después se vierte en 1 litro de éter frío como el hielo y el precipitado fino se filtra en vacío. Para la transformación en la sal ácido acética se disuelve el trifluoroacetato del amida dotriacontapéptido en ácido acético al 10 % y se filtra a través de una columna de intercambiadores de iones Merck Nr. II (forma acetato). El eluado se liofiliza.

10. El producto de partida se obtiene calentando 620 mg del derivado decaapéptido descrito en la solicitud suiza Nr. 15147/68 (Case 6548/1-4) BOC-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser(tBu)-Thr(tBu)-Cys-Met-Leu-Gly, 1130 mg de H-Thr(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Gln-Asp(OtBu)-Phe-Asn-Gly-Phe-His-Thr(tBu)-Phe-Pro-Gln-Thr(tBu)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-

15. Ala-Pro-NH₂, 160 mg de N-hidroxisuccinimida, 20 cc de dimetilformamida y 320 mg de dicitclohexilcarbodiimida durante 4 horas bajo intensa agitación a 45°. Después se vierte en 350 cc de éter libre de peróxido, el precipitado fino se separa por filtración en vacío y se seca a 35°. Se limpia mediante distribución de con-

20. tra-corriente en el sistema de disolventes metanol-tampón-cloroforno-tetraclorocarbono (10:3:5:4; tampón: como en el ejemplo 1).

El diglicil-amida docosapéptido (11-32) protegido, empleado como producto de partida, se obtiene en forma análoga a como se describe para el amida docosapéptido (11-32) correspondientemente protegido en la solicitud suiza arriba mencionada Nr. 15147/68

25. (Case 6548/1-4) en el ejemplo 1 bajo 11) hasta 56), empleando en lugar del derivado tirosina¹² y lisina¹⁸ los correspondientes derivados glicínicos.

372445



NOTA

Describe 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

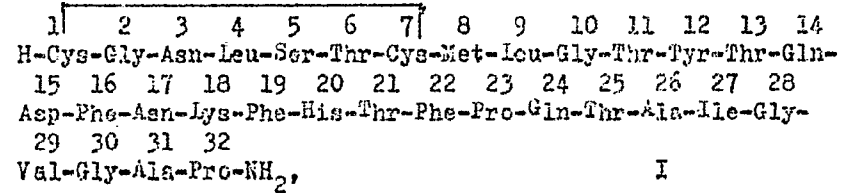
5. cuento no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a tres solicitudes de Patente presentadas en Suiza con los números y fechas siguientes: 15401/68 de 15 de octubre de 1.968,

10. 17286/68 de 20 de noviembre de 1.968, y 14586/69 de 26 de septiembre de 1.969, accogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita una Patente de Inven-

15. ción por 20 años, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE PEPTIDOS DE EFICACIA HIPOCALCEMICA; caracterizándose por lo siguiente:

1.- Procedimiento para la obtención de péptidos de eficacia hipocalcémica caracterizado porque los dotriacontapéptidos de fórmula I

20.



donde como mínimo uno y como máximo 16 de los aminoácidos en las

25. posiciones 2, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 y 31 están sustituidos por otros α-aminoácidos naturales ó sus homólogos, sus ésteres y derivados de los péptidos



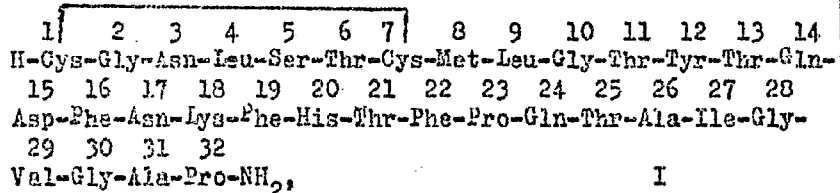
372445

13 OCT. 1969

monómeros ó dímeros, así como sales de adición de ácido y comple-
jos de los mencionados péptidos mono- ó dímeros, ó sus derivados,
se preparan según métodos conocidos.

2. Procedimientos según la reivindicación 1 caracterizado

5. porque los compuestos de fórmula I

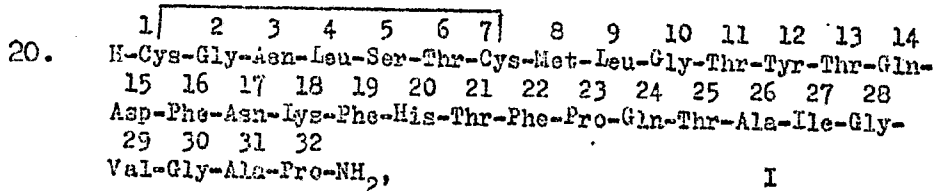


10.

donde como mínimo uno y como máximo 16 de los aminoácidos en las
posiciones 2, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 21, 23, 24, 25, 26,
27, 29, 30 y 31 están sustituidos por otros α -aminoácidos natu-
rales ó sus homólogos, sus dímeros y derivados de los péptidos

15. monómero ó dímeros, así como sales de adición de ácido y complejos
de los mencionados péptidos mono- ó dímeros, ó sus derivados, se
preparan sí

(1) en los compuestos de fórmula I



25 en los que como mínimo uno y como máximo 16 de los aminoácidos
en las posiciones 2, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 21, 23, 24,
25, 26, 27, 29, 30 y 31 están sustituidos por otros α -amino-
ácido naturales ó sus homólogos, ó los correspondientes dímeros

372445



3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2 caracterizado porque se preparan los compuestos de fórmula I, donde como mínimo uno y como máximo 16 de los aminoácidos 2,8,10,11, 12, 13, 14, 16, 18, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 y 31 están sustituidos por los aminoácidos existentes en las correspondientes posiciones de la tirocalcitonina porcina, ó las sales de adición de ácido ó los complejos de éstos compuestos.
- 5.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2 caracterizado porque, se prepara un dotriacontapéptido de fórmula I
10. I
H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-X-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-
Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-
15. Val-Gly-Ala-Pro-OH I
donde X significa el resto valina, norvalina, leucina, isoleucina, norleucina ó el resto ácido α -aminobutírico ó los derivados ó las sales de adición de ácido ó los complejos de éstos compuestos.
20. 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-4 para la preparación de nuevos péptidos según los procedimientos destacados en la descripción.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-5 caracterizado porque se parte de compuestos en los cuales los grupos carboxilo están protegidos por el grupo éster terc.-butílico.
- 25.

372445₁₃ 000



7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-6 caracterizado porque se parte de compuestos en los cuales los grupos amino están protegidos por el grupo terc.-butiloxycarbonilo.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-7 caracterizado porque se parte de compuestos en los cuales los grupos hidroxilo en las cadenas laterales están protegidos por el grupo terc.-butiléter.
9. Procedimiento para la obtención de nuevos péptidos, como indicado en las representaciones esquemáticas ó descrito en los ejemplos.
10. Procedimiento para la obtención de péptidos de eficacia hipocalcémica, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 97 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

CIBA SOCIÉTÉ ANONYME.

L. BOMEZ ACEBO Y MODER

Ing. Eduardo F. Hernández Roba

13 OCT. 1969