

376018



SOLICITANTE	
CLASIFICACION	AGI
SUBCLASE	K

PATENTE DE INVENCION

Clase 100-3044.
3100/KU/WR.

376018

Memoria Descriptiva

sobre:

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN POLIPEPTIDO

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

La presente invención se relaciona con un polipéptido hasta ahora desconocido de fórmula I,

H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-

Trp-Lys-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-His-Arg-Phe-Ser-Gly-

5.

Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂

376018 - 2 -



100-3044

sus sales de adición de ácido terapéuticamente activas, sus complejos de metal pesado, procedimientos para la producción de este compuesto y sus sales de adición de ácido, así como preparaciones farmacéuticas.

5 El polipeptido de fórmula I hasta ahora desconocido puede producirse mediante métodos para la síntesis de compuestos de este tipo en uso actual o descritos en la literatura sobre la materia, formándose el puente de disulfuro en una etapa apropiada de la síntesis.

10 La condensación de las unidades de péptido puede efectuarse, por ejemplo, haciendo reaccionar una unidad de péptido que tiene un grupo α -amino protegido y un radical carboxilo terminal activado con una unidad de péptido que tiene un grupo α -amino libre y un radical carboxilo terminal protegido o libre. Deberá entenderse que la expresión unidad de péptido incluye un
15 solo aminoácido.

El radical carboxilo puede activarse, por ejemplo, mediante conversión en una isoxazolida, imidazolida, anhídrido o azida de ácido o un éster activado, o mediante reacción con una carbodiimida o N,N' -carbonil-diimazol.

20 Los métodos de condensación preferidos son el método de la carbodiimida, el método de la azida, el método de los ésteres activados, el método del anhídrido y el método de Merrifield. En la última etapa de la condensación es conveniente emplear un método que evite o reduzca al mínimo la racemización, por ejemplo usando el
25 método de la azida o del éster activado, efectuándose la activación convenientemente con N -hidroxisuccinimida.



Los grupos funcionales libres que no participan en la reacción pueden protegerse como sigue durante la síntesis del péptido hasta ahora desconocido:

Con referencia a la secuencia parcial A, descrita más adelante, un radical adecuado para el bloqueo del radical γ -carboxilo es el radical butiloxi terc., pero también pueden usarse otros radicales protectores, tal como el radical metoxi, etoxi, amiloxi terc., amida o benciloxi.

Con referencia a la secuencia parcial C, descrita más adelante, un radical adecuado para el bloqueo del radical imidazol del radical histidina es el radical trifenilmetilo, pero también pueden usarse otros radicales protectores adecuados, tal como el radical carbo-butoxi terc., carbo-amiloxi terc., carbobenzoxi o bencilo.

Con referencia a la secuencia parcial C, descrita más adelante, un radical adecuado para el bloqueo del radical guanido del radical arginina es el radical nitro, pero también pueden usarse otros radicales protectores adecuados, tal como el radical tosilo, el radical *p*-nitrocarbobenzoxi o el radical 2-(isopropiloxicarbonil)-3,4,5,6-tetraclorobenzoilo. También es posible usar el efecto protector de la protonización del radical guanido durante la síntesis.

Con referencia a la secuencia parcial D, descrita más adelante, un radical adecuado para el bloqueo del radical ω -amino del radical lisina es un radical carbo-alcoxi terc., preferentemente el radical carbo-butoxi terc.

376018 - 4 -



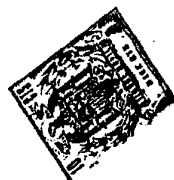
100-3044

Con referencia a las secuencias parciales F1 y F2, descritas más adelante, se usa preferentemente el radical bencilo o tritilo como radical protector mercapto de los grupos cistina. Los radicales bencilo o tritilo usados para la protección de los radicales SH
5 durante la síntesis de la secuencia parcial F generalmente se disocian al final de la síntesis mediante tratamiento con sodio en amoníaco líquido. Se ha encontrado ahora que la disociación del protector radical/bencilo o tritilo y la formación del puente S-S antes de la última etapa de la síntesis conducen a rendimientos particularmente
10 altos de producto final.

La conversión de un radical amino o mercapto protegido en un radical libre, así como la conversión de un radical carboxilo funcionalmente modificado en un radical carboxilo libre en el transcurso del procedimiento para la producción del nuevo polipéptido de
15 fórmula I se efectúa en forma de por sí conocida mediante tratamiento con agentes de hidrólisis o de reducción.

Los materiales iniciales para la producción del nuevo polipéptido de fórmula I, en cuanto hayan sido hasta ahora desconocidos, pueden obtenerse mediante métodos para la síntesis de
20 péptidos en uso actual o descritos en la literatura, pudiendo unirse los aminoácidos uno a la vez o después de la formación de unidades de péptido más pequeñas.

El nuevo polipéptido de fórmula I también puede obtenerse y usarse en la forma de sus sales. Ejemplos de sales son aquellas
25 con ácidos orgánicos, por ejemplo ácido acético, láctico, succínico,



benzoico, salicílico, metanosulfónico o toluenosulfónico, así como ácidos poliméricos, tal como el ácido tánico o la carboximetilcelulosa, y sales con ácidos inorgánicos, tal como ácidos halohídricos, por ejemplo ácido clorhídrico, o ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Un ejemplo de un complejo de metal pesado es un complejo formado con cinc $\oplus\oplus$.

El compuesto tiene el efecto de reducir el contenido de calcio en el plasma, especialmente un contenido alto o excesivo de calcio en el plasma. Los ensayos biológicos del nuevo compuesto efectuados con ratas indican un valor de 500 ± 100 unidades MRC por mg de péptido para la reducción del contenido de calcio en el plasma.

El nuevo compuesto puede usarse como medicamento, por ejemplo en la forma de preparaciones farmacéuticas. Estas pueden contener dicho compuesto en mezcla con un soporte o diluyente farmacéuticamente aceptable.

El nuevo compuesto y sus sales también pueden usarse como intermediarios para la producción de preparaciones farmacéuticas.

En el Ejemplo siguiente, que ilustra el procedimiento sin limitar en forma alguna el alcance de la invención, todas las temperaturas están indicadas en grados Centígrado. Las rotaciones ópticas se determinaron con una concentración de 1 molécula-gramo por litro.



En esta Memoria se usan las siguientes abreviaciones:

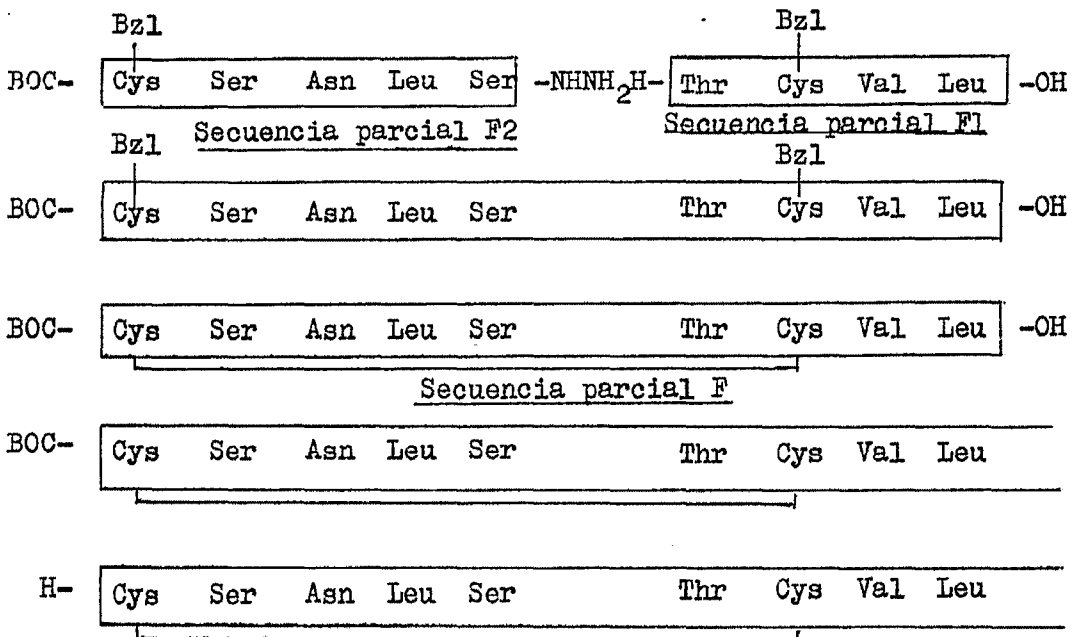
	Z	=	carbобенzoxi (benciloxicarbonilo)	
	Bzl	=	bencilo	
	BOC	=	butiloxi <u>tere.</u> -carbonilo	
5	Trt	=	tritilo = trifenilmetilo	
	OTB	=	butiloxi <u>tere.</u>	
	ONP	=	éster p-nitrofenílico	
	OCP	=	2,4,5-triclorofenoxi	
	OSu	=	N-hidroxisuccinimida	
10	OMe	=	metoxi	
	OEt	=	etoxi	
	NO ₂	=	nitro	
	Ser	=	L-serilo	
	Asn	=	L-asparaginilo	
15	Leu	=	L-leucilo	
	Lys	=	L-lisilo	
	Thr	=	L-treonilo	
	Val	=	L-valilo	
	Ala	=	L-alanilo	
20	Tyr	=	L-tirosilo	His = L-histidilo
	Trp	=	L-triptofanilo	Pro = L-prolilo
	Arg	=	L-arginilo	Gly = glicilo
	Phe	=	L-fenilalanilo	Met = L-metionilo
	Glu	=	L-glutamilo	Cys = L-cisteinilo

376018



1972

Parte 1





376018

376018

Trt
Trt- SAs Arg Phe -NHNH₂
 cuencia parcial C

Trt
Trt- SAs Arg Phe

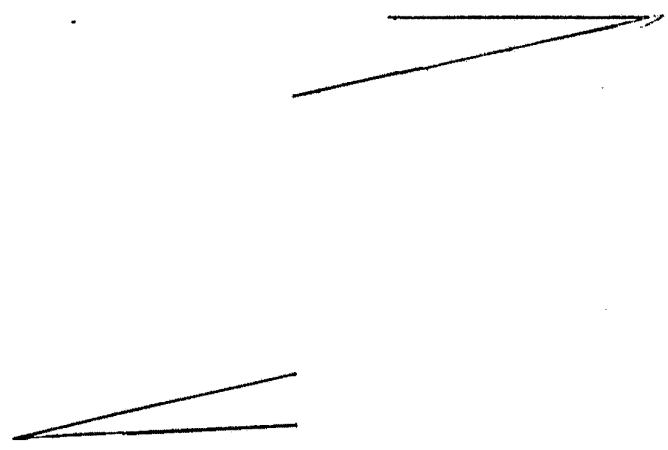
Trt- SAs Arg Phe

Trt- SAs Arg Phe

H- SAs Arg Phe

SAs Arg Phe

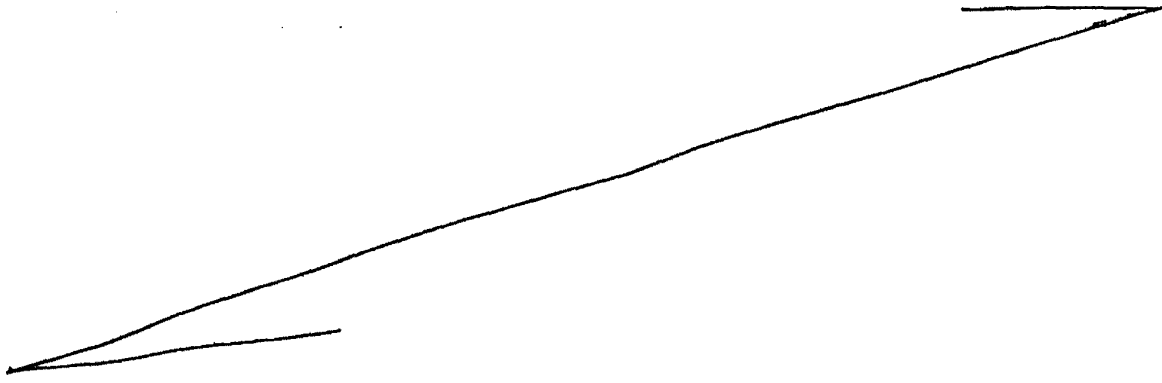
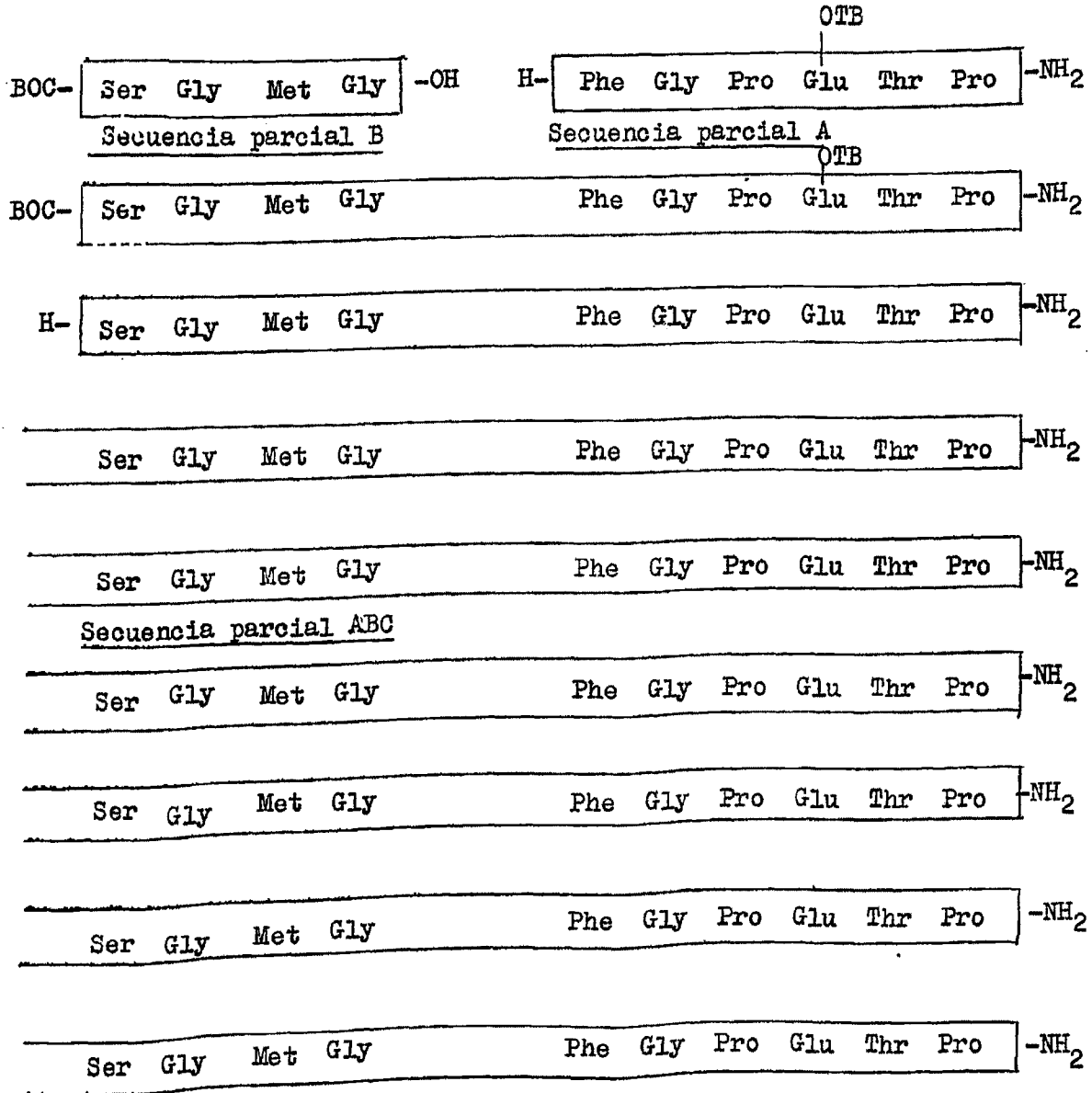
SAs Arg Phe



376018



Parte 3





EJEMPLO: H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys-
Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-
Glu-Thr-Pro-NH₂ . hexaacetato . decahidrato

3,3 g de la secuencia parcial ABCDEF se disuelven en 100 cc
 5 de ácido trifluoroacético en una atmósfera de nitrógeno, se deja re-
 posar la solución a 20° durante 15 minutos y luego se evapora hasta
 sequedad. El residuo se disuelve en 300 cc de ácido acético 0,2 normal,
 la solución se trata con 20 cc de amberlite-IRA-410 (acetato), se
 liofiliza, se lava con éter dietílico y se seca sobre hidróxido de
 10 potasio en alto vacío. Se obtiene el compuesto del título con un
 P.F. de 220° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$ en ácido acético normal.

Composición de aminoácidos después de la hidrólisis ácida

(6 normal, 16 horas):

15 Ala_{1.1}, Arg_{1.0}, Asp_{3.9}, Cys/2_{1.6}, Glu_{1.2}, Gly_{3.0}, His_{1.1},
 Lys_{1.1}, Leu_{2.9}, Met_{1.0}, Phe_{2.0}, Pro_{2.1}, Ser_{3.8}, Thr_{1.9},
 Tyr_{2.0}, Val 0.9 (Trp 1.0 mediante espectrofotometría).

El material inicial usado en el Ejemplo se produce
 como sigue:

Secuencia parcial A: H-Phe-Gly-Pro-Glu(OIB)-Thr-Pro-NH₂

20 134 g de Z-Thr-NH-NH₂ se disuelven a -5° en 2 litros de
 ácido clorhídrico normal, y se añaden 0,55 litros de nitrito sódico
 normal. Después de 5 minutos se añade carbonato de potasio hasta que
 el pH de la solución asciende a 9, la azida resultante se extrae con
 acetato de etilo, y se añade una solución de 80 g de H-Pro-NH₂.
 25 clorhidrato en 100 cc de agua, 500 cc de dimetilformamida y 77 cc de



trietilamina. El acetato de etilo se evapora a 20° en vacío, y la solución se deja reposar a 25° durante la noche. La solución restante se concentra mediante evaporación en vacío, el residuo se disuelve en acetato de etilo, la solución se lava con agua, ácido clorhídrico diluido y solución acuosa de carbonato de potasio y se seca sobre sulfato de sodio. La solución se evapora en vacío, el residuo se disuelve en acetato de etilo caliente y se enfría. Se obtiene Z-Thr-Pro-NH₂ con un P.F. de 148°, $[\alpha]_D^{20} = -72^\circ$ en ácido acético al 95 %. A continuación se disuelven 90 g de Z-Thr-Pro-NH₂ en dos litros de dioxano y 260 cc de ácido clorhídrico normal, y la solución se hidrogena a 20° y a presión normal en presencia de un catalizador de paladio. Se filtra, la solución se evapora en vacío, el residuo se lava con acetato de etilo, con lo cual se obtiene H-Thr-Pro-NH₂ . ClH con un P.F. de 216°, $[\alpha]_D^{20} = -64^\circ$ en ácido acético al 95 %. Este producto se disuelve en 500 cc de dimetilformamida, 50 cc de agua y 32 cc de trietilamina, y se añaden 118 g de Z-Glu(OTB)-OCP y 800 cc de tetrahidrofurano. La solución se deja reposar durante la noche a 20°, se evapora en vacío, y el residuo se cristaliza con éter dietílico. Se obtiene Z-Glu(OTB)-Thr-Pro-NH₂ con un P.F. de 65° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ en dimetilformamida. 80 g de Z-Glu(OTB)-Thr-Pro-NH₂ se disuelven en 1,5 litros de dioxano y 200 cc de agua, y se hidrogena a 20° y a presión normal en presencia de un catalizador de paladio. La solución se filtra y se evapora en vacío, y se le añade éter dietílico al residuo, con lo cual se obtiene H-Glu(OTB)-Thr-Pro-NH₂ con un P.F. de 65° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$ en

376018

- 12 -



100-3044

dimetilformamida. Este producto se disuelve en 700 cc de dimetil-
formamida a 0°, se añaden 200 cc de acetonitrilo, 68 g de
Z-Phe-Gly-Pro-OH, 18 g de N-hidroxisuccinimida y 32 g de carbodiimida
díciclohexílica, la mezcla se deja reposar a 20° durante la noche, se
5 filtra, la solución se concentra mediante evaporación en vacío y se
añade acetato de etilo. A continuación se lava la solución con agua,
ácido clorhídrico diluido y una solución acuosa de carbonato de
potasio, se seca sobre sulfato de sodio, se evapora en vacío, y el re-
siduo se cristaliza de acetato de etilo/éter dietílico. Se obtiene
10 Z-Phe-Gly-Pro-Glu(OEt)-Thr-Pro-NH₂ con un P.F. de 120° (descomp.),
 $[\alpha]_D^{20} = -66^\circ$ en dimetilformamida. Este producto se disuelve en 1500 cc
de dioxano y 300 cc de agua, se le añaden a la solución 30 g de carbón
de paladio al 10 % y se hidrogena hasta que queda finalizada la
absorción de hidrógeno. Se filtra, el filtrado se evapora y el residuo
15 se cristaliza de dioxano. Se obtiene la secuencia parcial A con un
P.F. de 153°, $[\alpha]_D^{20} = -79^\circ$ en dimetilformamida.

Secuencia parcial B: BOC-Ser-Gly-Met-Gly-OH

a) H-Met-Gly-OEt . ClH

65 g de BOC-Met-OH se disuelven en 900 cc de cloroformo,
20 la solución se enfría a -10°, se añaden 30 cc de N-metilmorfolina y
35,6 g de éster isobutílico del ácido clorofórmico. Después de diez
minutos se añade lentamente una solución de 30 g de éster etílico de
glicina en 200 cc de cloroformo, y la solución se deja reaccionar a
20° durante 1 hora. La solución se extrae con hidróxido de amonio
25 0,5 normal, luego con ácido sulfúrico 0,2 normal, se lava con agua

376018¹³ -



100-3044

hasta neutralidad, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación. Después de recrystalizar de éter de petróleo se obtiene BOC-Met-Gly-OEt con un P.F. de 49°, $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ en etanol. Este producto se disuelve en 750 cc de ácido clorhídrico 4 normal /
5 etanol, la solución se deja reposar a 25° durante 1 hora, se evapora, el residuo se lava con éter dietílico y se seca hasta que se obtiene un peso constante. Se obtiene el compuesto indicado en el título a) en forma de un aceite.

b) BOC-Ser-Gly-OEt

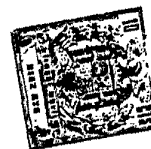
10 12,5 g de N-butiloxi terc.-carbonil-serina se disuelven en 100 cc de cloroformo, y se añaden 6,1 g de N-metilmorfolina; a continuación se añaden por gotas 8,2 g de éster isobutílico del ácido clorofórmico. Después de 10 minutos se añade una solución de 6,6 g de éster etílico de glicina en 50 cc de cloroformo, y la solución se
15 agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de la reacción se lava con amoníaco diluido, luego con solución de ácido clorhídrico, se seca sobre sulfato de sodio, y la fase orgánica se evapora. Se obtiene el compuesto del título b) en forma de un aceite.
 $[\alpha]_D^{20} = -3^\circ$ en dimetilformamida.

20 c) BOC-Ser-Gly-NH-NH₂

19,4 g de BOC-Ser-Gly-OEt se disuelven en 270 cc de alcohol etílico, se añaden 48,6 cc de hidrato de hidracina, y la solución se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 días. A continuación se evapora la solución y el residuo se cristaliza de una
25 mezcla (1:3) de alcohol metílico/éter dietílico. Se obtiene el

376018

- 14 -



100-3044

compuesto indicado en el título c) con un P.F. de 157°, $[\alpha]_D^{20} = -5^\circ$ en dimetilformamida.

d) BOC-Ser-Gly-Met-Gly-OEt

25 cc de una solución 4 normal de cloruro de hidrógeno en
5 éter etílico se añaden a 200 cc de dimetilformamida, y en esta
solución se disuelven 11 g de BOC-Ser-Gly-NH-NH₂ a -10°. A con-
tinuación se añaden por gotas a -10° 5,4 cc de nitrito butílico
terc., se le añaden a la solución 18 cc de trietilamina y luego una
solución de 12 g de H-Met-Gly-OEt . ClH en 100 cc de dimetil-
10 formamida y 6,2 cc de trietilamina. La solución se agita a temperatura
ambiente durante 3 horas, se filtra después de 12 horas y se concentra
mediante evaporación. El residuo se disuelve en cloroformo, se lava
sucesivamente con solución diluida de amoníaco y de ácido clorhídrico,
se seca sobre sulfato de sodio y se evapora. Se obtiene el compuesto
15 indicado en el título d) con una rotación óptica de $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ en
dimetilformamida.

e) Secuencia parcial B

24 g de BOC-Ser-Gly-Met-Gly-OEt se disuelven en 250 cc de
dioxano, se añaden 75 cc de solución normal de hidróxido de sodio, la
20 solución se agita a 25° durante 1 hora, se trata con 150 cc de
Dowex-50 (forma H⁺), se filtra, el filtrado se evapora y el residuo se
cristaliza de acetato de etilo/éter dietílico. Se obtiene la
secuencia parcial B con un P.F. de 87° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$
en dimetilformamida.

376018

- 15 -



100-3044

Secuencia parcial C: Trt-His(Trt)-Arg-Phe-NH-NH₂ . ClH

a) Z-Arg(NO₂)-Phe-OMe

51,8 g de H-Phe-OMe . ClH se disuelven en 1 litro de éter dietílico y aprox. 50 cc de agua de hielo, y se añade una cantidad
5 suficiente de carbonato de sodio con agitación y enfriamiento hasta que toda el agua ha sido absorbida. Se filtra y el filtrado se evapora hasta que se obtiene un peso constante, con lo cual resulta un aceite incoloro.

67,6 g de Z-Arg(NO₂)-OH se disuelven en 300 cc de acetonitrilo y 150 cc de dimetilformamida, y se añaden 41,2 g de H-Phe-OMe. La solución se enfría luego a -20° y se añade una solución de 43,4 g de carbodiimida diciclohexílica en 100 cc de acetonitrilo. La mezcla de la reacción se deja reposar en un refrigerador durante
15 4 horas agitando de vez en cuando. El precipitado resultante se separa mediante filtración y el filtrado se concentra mediante evaporación. El residuo de la evaporación se disuelve en 1 litro de acetato de etilo, y a continuación se lava en frío con solución normal de hidróxido de sodio, agua, ácido sulfúrico normal, agua, y una solución saturada de sal común. La fase de acetato de etilo que ha sido secada
20 sobre sulfato de sodio se concentra completamente mediante evaporación. Después de recrystalizar de acetato de etilo/éter de petróleo se obtiene el compuesto del título a) con un P.F. de 131-133°, $[\alpha]_D^{20} = -7^\circ$ en metanol, -4° en dimetilformamida.

376018

- 16 -



100-3044

b) H-Arg(NO₂)-Phe-OMe . 0,5 H₂O . 1,2 BrH

20 g de Z-Arg(NO₂)-Phe-OMe se disuelven en 50 cc de ácido acético glacial, y se añaden 50 cc de ácido bromhídrico al 40 % en ácido acético glacial con ligero enfriamiento. La mezcla de la re-
5 acción se deja luego reposar a 20° durante 1 hora sacudiendo de vez en cuando. La solución se concentra completamente mediante evaporación, después de lo cual se disuelve el residuo en 200 cc de agua y se lava 2 veces con éter dietílico. La fase acuosa se concentra completamente mediante evaporación y el residuo se recrystaliza de metanol/éter
10 dietílico. Se obtiene el compuesto del título b) con un P.F. de 165-167° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ$ en metanol, $+14^\circ$ en dimetilformamida.

c) Z-His(Z)-Arg(NO₂)-Phe-OMe

46,1 g de H-Arg(NO₂)-Phe-OMe . 0,5 H₂O . 1,2 BrH se di-
15 suelven en 100 cc de agua, la solución se calienta y a continuación se enfría. Después de la adición de cloroformo y hielo, se ajusta el pH de la solución a 9 con amoníaco. La fase de cloroformo se lava nuevamente con agua, se seca a continuación sobre carbonato de sodio y se filtra. Se le añade al filtrado una solución de 44,5 g de
20 Z-His(Z)-OH, 12,1 g de N-hidroxisuccinimida en 200 cc de acetónitrilo y 100 cc de piridina, la mezcla de la reacción se enfría a -20°, y se añade una solución de 21,1 g de carbodiimida dicitclohexílica en 70 cc de acetónitrilo. A continuación se deja reposar la solución en un refrigerador durante 4 horas agitando de vez en cuando.
25 El precipitado resultante se separa mediante filtración y el filtrado



376018

se concentra mediante evaporación. El residuo se recoge en acetato de etilo y a continuación se lava como sigue: solución de carbonato de potasio al 10 % (pH ~ 10), agua, solución saturada de sal común, agua, solución saturada de sal común, ácido sulfúrico (pH 3), agua, solución de sal común. La fase de acetato de etilo que ha sido secada sobre sulfato de sodio se concentra completamente mediante evaporación, con lo cual se obtiene una espuma de color beige claro. Esta espuma se disuelve 2 veces en una pequeña cantidad de metanol y se precipita cada vez con éter dietílico. Las fases de éter se decantan y el precipitado se seca; se obtiene el compuesto del título c) (espuma amorfa), con una rotación óptica de $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ en metanol, -8° en dimetilformamida.

d) H-His-Arg-Phe-OMe . 4 ClH

25 g de Z-His(Z)-Arg(NO₂)-Phe-OMe se disuelven en 800 cc de ácido acético glacial. A continuación se agitan 10 g de paladio al 10 % sobre carbón vegetal activo en 200 cc de ácido clorhídrico normal, y ésto se añade a la solución. La solución de la reacción se hidrogena durante 2 horas y a continuación se separa el catalizador mediante filtración. Se le añaden al filtrado nuevamente 5 g de paladio al 10 % sobre carbón vegetal activo, se hidrogena, la hidrogenación queda finalizada después de 5 horas y media, absorbiéndose aprox. 80 % de la cantidad teórica de hidrógeno. El catalizador se separa mediante filtración y el filtrado se concentra completamente mediante evaporación, con lo cual se obtiene el compuesto del título d) en forma de espuma amorfa.



376018

e) Trt-His(Trt)-Arg-Phe-OMe . ClH

21,5 g de H-His-Arg-Phe-OMe . 4 ClH se disuelven en 100 cc de piridina y aprox. 100 cc de dimetilformamida. Se añade trietilamina a aprox. +5° hasta que el pH de la solución asciende a 9, y a continuación se añade por gotas en el transcurso de 5 minutos una solución de 29 g de cloruro de tritilo en 300 cc de piridina. Una vez finalizada la adición se determina de vez en cuando el pH de la solución y en caso necesario se ajusta nuevamente a aprox. 9 con trietilamina. Después de aprox. 4 horas la solución se concentra mediante evaporación, el residuo se recoge en cloroformo y agua, y el pH de la solución se ajusta a 4 con la adición de una pequeña cantidad de ácido clorhídrico normal. La fase de cloroformo se separa, se lava 2 veces con agua, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra completamente mediante evaporación. Se le añade éter al residuo y a continuación se separa el éter dietílico mediante filtración, con lo cual se obtiene el compuesto indicado en el título e).

f) Secuencia parcial C

17 g de Trt-His(Trt)-Arg-Phe-OMe . ClH se disuelven en 200 cc de metanol y se añaden 40 cc de hidrato de hidracina. A continuación se deja reposar la solución a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución se evapora, el residuo se disuelve en cloroformo y se lava 2 veces con agua. La fase de cloroformo se seca sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación. El residuo se lava a continuación con éter dietílico y se separa mediante filtración; éste es la secuencia parcial C con una rotación óptica de $[\alpha]_D^{18} = -9^\circ$ en dimetilformamida.

570018

19 -



100-3044

Secuencia parcial D: H-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe

a) Z-Asn-Tyr-OMe

89 g de Z-Asn-OCP y 31 g de H-Tyr-OMe se disuelven en 500 cc de dimetilformamida, la solución se deja reposar a temperatura ambiente durante la noche y se precipita en éter, el precipitado se separa mediante filtración y se lava con éter dietílico, se disuelve en dimetilformamida y se precipita en agua, el precipitado se separa mediante filtración, se lava nuevamente con agua y se seca. Se obtiene el compuesto del título a) con un P.F. de 199°, $[\alpha]_D^{20} = +6^\circ$ en dimetilformamida.

b) H-Asn-Tyr-OMe . ClH

31 g de Z-Asn-Tyr-OMe se disuelven en 500 cc de dioxano y 85 cc de ácido clorhídrico normal, se hidrogena a 25° en presencia de un catalizador de paladio, se filtra, el filtrado se evapora, el residuo se lava con éter dietílico y se seca. Se obtiene el compuesto indicado en el título b) con una rotación óptica de $[\alpha]_D^{20} = +29^\circ$ en dimetilformamida.

c) Z-Asn-Asn-Tyr-OMe

34,6 g de H-Asn-Tyr-OMe . ClH y 57 g de Z-Asn-OCP se disuelven en 500 cc de dimetilformamida, se añaden 6 cc de ácido acético glacial y a continuación 14 cc de trietilamina. La mezcla de la reacción se deja reposar a 25° durante 2 días y se precipita en éter dietílico. El precipitado se disuelve en dimetilformamida, se precipita en agua, el precipitado se separa mediante filtración y se lava nuevamente con agua. Se obtiene el compuesto del título c) con un P.F. de 220°, $[\alpha]_D^{20} = -4^\circ$ en dimetilformamida.



376018

d) H-Asn-Asn-Tyr-OMe . CH₃COOH

42 g de Z-Asn-Asn-Tyr-OMe se disuelven en 750 cc de dimetilformamida y se añaden 80 cc de ácido acético normal. Se hidrogena a 25° en presencia de un catalizador de paladio, se filtra
5 y el filtrado se evapora. El residuo se disuelve en agua caliente y se seca con congelación. Se obtiene el compuesto indicado en el título d) con un P.F. de 168°, $[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$ en dimetilformamida.

e) Z-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe

40 g de Z-Leu-OCP y 33 g de H-Asn-Asn-Tyr-OMe . CH₃COOH
10 se disuelven en 500 cc de dimetilformamida, la solución se deja reposar a 25° durante 2 días y se precipita en éter dietílico. El precipitado se disuelve en dimetilformamida, se precipita con agua, el precipitado se separa mediante filtración y se lava nuevamente con agua. Se obtiene el compuesto del título e) con un P.F. de 241°,
15 $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ en dimetilformamida.

f) H-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe

34 g de Z-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe se disuelven en 500 cc de una mezcla de dimetilformamida/agua (8:2) y se hidrogena en presencia de un catalizador de paladio a 20°. Se filtra y el filtrado
20 se evapora. El residuo se disuelve en agua caliente y se seca con congelación. Se obtiene el compuesto indicado en el título f) con un P.F. de 175°, $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ en dimetilformamida.

g) Z-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe

45 g de Z-Asn-OCP y 26,5 g de H-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe se
25 disuelven en 500 cc de dimetilformamida, la solución se deja reposar a



376018

25° durante 2 días, se añade por gotas a éter dietílico, se separa mediante filtración, se lava nuevamente con éter dietílico y se seca. El residuo se disuelve en dimetilformamida, se precipita con agua, se separa mediante filtración y se lava nuevamente con agua. Se obtiene el compuesto indicado en el título g) con un P.F. de 255°, $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ en dimetilformamida.

h) H-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe . CH₃COOH

32,8 g de Z-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe se disuelven en dos litros de dimetilformamida, se hidrogena a 20° en presencia de un catalizador de paladio y se añaden 60 cc de ácido acético normal. La solución se filtra y el filtrado se concentra mediante evaporación. El residuo se disuelve en agua caliente y se seca con congelación. Se obtiene el compuesto indicado en el título h) con un P.F. de 210°, $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ en dimetilformamida.

15 i) Z-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe

12,6 g de Z-Lys(BOC)-OCP y 11 g de H-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe . CH₃COOH se disuelven en 500 cc de dimetilformamida, la solución se deja reposar a 25° durante 2 días, se añade por gotas a éter, se filtra, se lava con éter y se seca. El residuo se disuelve en dimetilformamida, se precipita con agua, se separa mediante filtración y se lava nuevamente con agua. Se obtiene el compuesto indicado en el título i) con un P.F. de 242°, $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ en dimetilformamida.

376018²² -



100-3044

j) Secuencia parcial D

11 g de Z-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe se disuelven en 300 cc de dimetilformamida y se hidrogena a 20° y a presión normal en presencia de un catalizador de paladio. La solución se filtra y el
5 producto se precipita en éter dietílico. El precipitado se lava con éter dietílico, con lo cual se obtiene la secuencia parcial D con un P.F. de 221°, $[\alpha]_D^{20} = -26^\circ$ en dimetilformamida.

Secuencia parcial E: Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-NH-NH₂

a) H-Tyr-Trp-OMe

85 g de Z-Tyr(Z)-Trp-OMe se disuelven en una mezcla de
1000 cc de dioxano/agua (8:2) con 145 cc de ácido clorhídrico normal y se hidrogena en presencia de un catalizador de paladio hasta que
cesa la absorción de hidrógeno. Después de separar el catalizador mediante filtración se concentra la solución mediante evaporación y se
15 añaden 500 cc de agua. La fase acuosa se lava con acetato de etilo y se alcaliniza con hidrogencarbonato de potasio sólido. Después de extraer repetidamente con éter dietílico y de concentrar mediante evaporación se obtiene el compuesto del título a) con un P.F. de 85°, $[\alpha]_D^{20} = -2^\circ$ en dimetilformamida.

20 b) Trt-Ser-Ala-OMe

60 g de H-Ala-OMe . ClH y 130 g de Trt-Ser-OH se disuelven en una mezcla de 1400 cc de acetonitrilo/dimetilformamida (1:1) y se añaden 60 cc de trietilamina. Después de añadir 52 g de N-hidroxisuccinimida se enfría la solución a 0° y se sacude con
25 97 g de carbodiimida dicitclohexílica durante 5 horas. Después de



filtrar se concentra la solución mediante evaporación, se añade acetato de etilo, y se lava la solución con ácido acético diluido y solución de hidrogencarbonato de potasio. Después de secar, de concentrar mediante evaporación y de tratar con éter dietílico se obtiene el compuesto del título b) con un P.F. de 146°, $[\alpha]_D^{20} = -56^\circ$ en dimetilformamida.

c) Trt-Ser-Ala-NH-NH₂

82 g de Trt-Ser-Ala-OMe se disuelven en 800 cc de metanol y se añaden 80 cc de hidrato de hidracina. La solución se deja reposar a 20° durante 24 horas, después de lo cual se concentra mediante evaporación, y el residuo se lava con éter dietílico y agua. Se obtiene el compuesto del título c) con un P.F. de 126°, $[\alpha]_D^{20} = +38^\circ$ en dimetilformamida.

d) Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-OMe

30 g de Trt-Ser-Ala-NH-NH₂ se disuelven en 170 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20° y se añaden 100 cc de ácido clorhídrico 2 normal en dioxano. Después de la adición de 8,5 cc de nitrito butílico tere. se agita la solución a -20° durante diez minutos más y se combina con una solución de dimetilformamida conteniendo 31 g de H-Tyr-Trp-OMe . ClH y 50 cc de trietilamina. Después de sacudir durante 2 horas se evapora la solución y se recoge el residuo en acetato de etilo. Después de lavar con ácido acético diluido, amoníaco, de secar sobre sulfato de sodio y de concentrar mediante evaporación, se obtiene el compuesto del título d) con un P.F. de 143°, $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$ en dimetilformamida.

376018 24 -



100-3044

e) Secuencia parcial E

30 g de Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-OMe se disuelven en 300 cc de metanol y se añaden 30 cc de hidrato de hidracina. La solución se deja reposar a 20° durante 24 horas y se evapora. El residuo se trata con
5 éter dietílico y agua. La secuencia parcial E resultante tiene un P.F. de 196°, $[\alpha]_D^{20} = +10^\circ$ en dimetilformamida.

Secuencia parcial F1: H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH

a) H-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe . BrH

21,0 g de Z-Cys(Bzl)-OCP y 12,3 g de H-Val-Leu-OMe . ClH
10 se disuelven en 120 cc de dimetilformamida. A continuación se añaden 5,9 cc de trietilamina, la solución se deja reposar a 25° durante 16 horas, se añade acetato de etilo, la solución se lava con ácido clorhídrico diluido, se seca sobre sulfato de sodio, se evapora hasta sequedad, y el residuo se cristaliza de acetato de etilo/éter
15 dietílico. Se obtiene Z-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe con un P.F. de 160°, $[\alpha]_D^{20} = -28^\circ$ en dimetilformamida, y este producto se disuelve en 210 cc de una solución al 40 % de bromuro de hidrógeno en ácido acético glacial. La solución se deja reposar a 25° durante 1 hora, se evapora hasta sequedad, y el residuo se recrystaliza de isopropanol/éter
20 dietílico. Se obtiene el compuesto del título a) con un P.F. de 168°, $[\alpha]_D^{20} = +14^\circ$ en dimetilformamida.

b) H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe . 1,3 BrH

20 g de Z-Thr-NH-NH₂ se disuelven en 350 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20°, se añaden 100 cc de una
25 solución de ácido clorhídrico 2 normal en dioxano, y a continuación



se añaden 10 cc de nitrito butílico terc. La solución se deja reposar a -20° durante 10 minutos, después de lo cual se añaden 45 cc de trietilamina y 25,5 g de H-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe . BrH y la mezcla de la reacción se sacude a 0° durante 16 horas. La mezcla de la reacción se evapora hasta sequedad, el residuo se disuelve en una mezcla de acetato de etilo/agua, la fase orgánica se lava con ácido clorhídrico diluido, se seca sobre sulfato de sodio y se evapora, y el residuo se recrystaliza de acetato de etilo. Se obtiene Z-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe con un P.F. de 208° , $[\alpha]_D^{20} = -27^{\circ}$ en dimetilformamida. 20 g del tetrapéptido arriba obtenido se disuelven en 200 cc de una mezcla de ácido trifluoroacético/acetato de etilo (1:1), se pasa una corriente de bromuro de hidrógeno gaseoso a través de la solución a 0° durante 1 hora, la solución se evapora a continuación y el residuo se recrystaliza de metanol/éter dietílico. Se obtiene el compuesto del título b) con un P.F. de 202° , $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ}$ en dimetilformamida.

c) Secuencia parcial F1

372 g de H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe . 1,3 BrH se disuelven en 1800 cc de metanol, se añaden 900 cc de una solución 2 normal de hidróxido de sodio, la solución se deja reposar a 25° durante 1 hora, se añaden 240 cc de ácido acético glacial, y la solución se deja reposar a 0° durante 2 horas. La masa cristalina precipitada se separa mediante filtración, se lava primero con ácido acético normal, a continuación con agua y se seca a 50° en alto vacío. Se obtiene la secuencia parcial F1 con un P.F. de 219° , $[\alpha]_D^{20} = -53^{\circ}$ en amoníaco normal.

376018²⁶ -



100-3044

Secuencia parcial F2: BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NH-NH₂

a) H-Asn-Leu-Ser-OMe . ClH

43 g de H-Leu-Ser-OMe . ClH y 53 g de BOC-Asn-ONP se disuelven en 400 cc de dimetilformamida, se añaden 22 cc de trietil-
5 amina, la solución se deja reposar a 25° durante 16 horas, se evapora hasta sequedad, y el residuo se recristaliza de metanol. Se obtienen 51,6 g de BOC-Asn-Leu-Ser-OMe con un P.F. de 190°, $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$ en dimetilformamida, y este producto se disuelve en 500 cc de una
10 solución 4 normal de ácido clorhídrico en metanol. La solución se deja reposar a 25° durante 1 hora, se evapora hasta sequedad, el residuo se disuelve en metanol y se precipita con éter dietílico. Se obtiene el compuesto del título a) con un P.F. de 180°, $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ en dimetilformamida.

b) H-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe . ClH

15 39,5 g de BOC-Ser-NH-NH₂ se disuelven en 500 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20°, se añaden 200 cc de una solución 2 normal de ácido clorhídrico en dioxano, y a continuación se añaden 20 cc de nitrito butílico terc. La solución se deja reposar a -20° durante 10 minutos, después de lo cual se
20 añaden 40 cc de trietilamina y 38,0 g de H-Asn-Leu-Ser-OMe . ClH , a continuación se agita la mezcla de la reacción a 0° durante 16 horas, se evapora hasta sequedad, y el residuo se recristaliza de cloroformo/éter dietílico. Se obtiene BOC-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe con un P.F. de 135°, $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ en dimetilformamida, y este producto se
25 disuelve en 420 cc de una solución 4 normal de ácido clorhídrico en



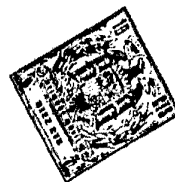
metanol. La solución se deja reposar a 25° durante 1 hora, se evapora hasta sequedad y se recristaliza de metanol/acetato de etilo. Se obtiene el compuesto indicado en el título b) con un P.F. de 155° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ en dimetilformamida.

5 c) Secuencia parcial F2

18,5 g de H-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe . ClH y 18 g de BOC-Cys(Bzl)-ONP se disuelven en 100 cc de dimetilformamida, se añaden 10 cc de agua, 3,5 cc de ácido acético y 5,6 cc de trietilamina, la solución se deja reposar a 25° durante 16 horas, se evapora hasta sequedad y se recristaliza de metanol. Se obtienen 25,1 g de BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe con un P.F. de 182°, $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ en dimetilformamida, y este producto se disuelve en 200 cc de dimetilformamida con ligero calentamiento. Se añaden 200 cc de metanol y 20 cc de hidrato de hidracina, la mezcla se deja reposar a 30° durante 16 horas, se precipita con éter dietílico, el precipitado se lava con éter dietílico/metanol (1:1), y la secuencia parcial F2 resultante, que tiene un P.F. de 224°, $[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$ en dimetilformamida, se seca.

Secuencia parcial F: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH

18,4 g de BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NH-NH₂ (secuencia parcial F2) se disuelven en 150 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20°, se añaden 40 cc de una solución 2 normal de ácido clorhídrico en dioxano y 15 cc de nitrito butílico terc. La solución se deja reposar a -20° durante 10 minutos, después de lo cual se añaden 28 cc de trietilamina y 16,2 g de H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH (secuencia parcial F1), y la mezcla se agita a 25° durante 16 horas.



La mezcla de la reacción se filtra, la solución se concentra mediante evaporación y el residuo se lava con ácido acético normal. Se obtiene BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH con un P.F. de 217°, $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ en dimetilformamida.

5 El producto resultante se disuelve en 5000 cc de amoníaco secado, se añade metal de sodio con agitación y mientras hierve el amoníaco, hasta que se obtiene una coloración azul oscura. Se descolora mediante la adición de cloruro de amonio. La solución se evapora hasta sequedad y el residuo se lava con ácido acético normal y acetona. Después de secar se obtiene BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-
10 Cys-Val-Leu-OH con un P.F. de 248° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -41^\circ$ en dimetilformamida/agua (3:1).

El nonapéptido obtenido se disuelve en 5000 cc de amoníaco 0,01 normal, se añade peróxido de hidrógeno normal con agitación
15 hasta que se obtiene una reacción negativa al nitroprusiato, luego se añaden 200 cc de ácido acético glacial, se filtra y se liofiliza. Se obtiene la secuencia parcial F con un P.F. de 238° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ en dimetilformamida/agua (3:1).

20 Secuencia parcial ABC: H-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂ . 3 CH₂COOH

a) H-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂ . ClH

6,7 g de BOC-Ser-Gly-Met-Gly-OH (secuencia parcial B),
12 g de H-Phe-Gly-Pro-Glu(OIB)-Thr-Pro-NH₂ (secuencia parcial A) y
2,1 g de N-hidroxisuccinimida se disuelven en 50 cc de dimetil-
25 formamida y 20 cc de acetonitrilo, la solución se enfría a 0°, se



añaden 4,0 g de carbodiimida dicitclohexílica, y la solución se deja reposar a 0° durante 16 horas. El disolvente se separa mediante evaporación, el residuo se lava con agua, éter dietílico y acetato de etilo, y se recristaliza de cloroformo. Se obtiene

5 BOC-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu(OEB)-Thr-Pro-NH₂ con un P.F. de 121° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -47^\circ$ en dimetilformamida, y este producto se disuelve en 250 cc de una solución de cloruro de hidrógeno 8 normal en dioxano. La solución se agita a 25° durante 2 horas, se evapora hasta sequedad, y el residuo se trata con éter dietílico. Se obtiene

10 el compuesto indicado en el título a) con un P.F. de 130° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -48^\circ$ en dimetilformamida.

b) Secuencia parcial ABC

9,9 g de Trt-His(Trt)-Arg-Phe-NH-NH₂ (secuencia parcial C) se disuelven en 100 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a

15 -20°, se añaden 15 cc de dioxano/ácido clorhídrico 2 normal, y a continuación se añaden 1,16 cc de nitrito butílico terc., la mezcla se agita a -20° durante 10 minutos, se añaden 28 cc de trietilamina y 10,0 g de H-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂ · ClH, la mezcla se agita a 0° durante 4 horas, se filtra y se evapora hasta

20 sequedad. El residuo se disuelve en una mezcla de acetato de etilo / metanol (8:2), la solución se lava con amoníaco diluido y a continuación con agua hasta neutralidad, se seca sobre sulfato de sodio, se concentra hasta 100 cc y se precipita mediante la adición de éter dietílico. El precipitado se disuelve nuevamente en dimetil-

25 formamida, y la solución se precipita mediante la adición de éter

376018-30-



100-3044

dietílico. Se obtiene Trt-His(Trt)-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂ con un P.F. de 168° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ en dimetilformamida, y este producto se disuelve en 500 cc de ácido acético/agua (8:2). La solución se calienta a 90° durante 20 minutos, se evapora, el residuo se lava en éter dietílico y se seca en alto vacío sobre limaduras de hidróxido de potasio. Se obtiene la secuencia parcial ABC con un P.F. de 180° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -66^\circ$ en ácido acético.

Secuencia parcial DE: Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-NH-NH₂

a) Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe

4,3 g de Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-NH-NH₂ se disuelven en 50 cc de dimetilformamida, y en esta solución se disuelven a -20° 8,2 cc de una solución 2,3 normal de cloruro de hidrógeno en dioxano. A continuación se añaden por gotas a -20° 1,3 cc de una solución de nitrito butílico terc./dioxano (1:1), se añaden 3,5 cc de trietilamina y luego 4,5 g de H-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe en 200 cc de dimetilformamida. La solución se agita a temperatura ambiente durante 3 horas y a continuación se filtra. El filtrado se concentra mediante evaporación y el residuo se pulveriza con acetato de etilo. Después de filtrar y de lavar con acetato de etilo y agua se obtiene el compuesto del título a) con un P.F. de 240° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -2^\circ$ en dimetilformamida.



b) Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-NH-NH₂

6 g de Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-OMe se disuelven en 60 cc de dimetilformamida, se añaden 6 cc de hidrato de hidracina, y la solución se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 días. La solución se evapora a continuación y el residuo se tritura con agua, se lava con agua y éter. Se obtiene la secuencia parcial DE con un P.F. de 244°, $[\alpha]_D^{20} = -9^\circ$ en dimetilformamida.

Secuencia parcial ABCDE: H-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂ . 2 AcOH

a) Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂

10,5 g de Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-NH-NH₂ se disuelven en 200 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20° y se añade una solución de ácido clorhídrico en dioxano. A continuación se añade por gotas 1 cc de nitrito butílico terc. y la solución se combina con una solución conteniendo 10,5 g de H-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂ y 15 cc de trietilamina en 100 cc de dimetilformamida. Después de dos horas se precipita la solución con éter y se lava con cloroformo y agua. Se obtiene el compuesto del título a) con un P.F. de 242°, $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ en dimetilformamida.

b) Secuencia parcial ABCDE

15 g de Trt-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂

376018³² -



100-3044

se disuelven en 500 cc de ácido acético al 80 %, y la solución se deja reposar a 40° durante 2 horas. Después de concentrar mediante evaporación y de tratar con éter se obtiene la secuencia parcial ABCDE con un P.F. de 238°, $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ en ácido acético.

5 Secuencia parcial ABCDEF: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Ser-Ala-Tyr-Trp-Lys(BOC)-Asn-Leu-Asn-Asn-Tyr-His-Arg-Phe-Ser-Gly-Met-Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Thr-Pro-NH₂ . acetato . trihidrato

1,0 g de nonapéptido (secuencia parcial F) se disuelve en 10 cc de dimetilformamida, se añaden 1,5 g de N-hidroxisuccinimida y 0,52 g de carbodiimida dicitclohexilica, la solución se agita a 25° durante 6 horas, se filtra, y el filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se lava con acetato de etilo y éter dietílico y se seca. Se obtiene BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-O-Su con un P.F. de 242°, y este producto se disuelve en 10 cc de dimetilformamida. Se le añaden a esta solución 3,1 g de tricosapéptido diacetato (secuencia parcial ABCDE) y 1,2 g de N-hidroxisuccinimida, y se agita a 25° durante 16 horas. La solución se evapora hasta sequedad, el residuo se lava con éter dietílico, cloroformo y acetona. Se obtiene el dotriacontapéptido protegido, bruto, y éste se disuelve en 50 cc de una mezcla de cloroformo/metanol/agua (70:30:5). La solución resultante se coloca sobre una columna de gel de sílice (5 x 100 cm), que ha sido equilibrada con la mezcla arriba indicada.



Se efectúa la elución con una concentración creciente de metanol.
 Las fracciones combinadas, que contienen el péptido puro, se evaporan,
 a continuación se lavan con éter dietílico y se secan sobre hidróxido
 de potasio en alto vacío. Se obtiene la secuencia parcial ABCDEF con
 5 un P.F. de 240° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ en ácido acético normal /
 metanol (2:1).

Composición de aminoácidos después de la hidrólisis ácida

(6 normal, 16 horas):

Ala_{1.1}, Arg_{1.0}, Asp_{3.9}, Cys_{2.1.6}, Glu_{1.2}, Gly_{3.0}, His_{1.1},
 10 Leu_{2.9}, Lys_{1.0}, Met_{1.0}, Phe_{2.0}, Pro_{2.1}, Ser_{3.8}, Thr_{1.9},
 Tyr_{1.9}, Val 0.9 (Trp 1.0 mediante espectrofotometría).

- N O T A -

Descrita suficientemente la naturaleza del invento,
 así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse
 15. constar que las disposiciones anteriormente indicadas son su-
 ceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren
 su principio fundamental. También se hace constar que el inven-
 to corresponde a unas solicitudes de patentes presentadas en
 Suiza nos: 1508/69 de 31 de enero de 1969, 5814/69 de 17 de
 20. abril de 1969, de 19 de diciembre de 1969, aco-
 acciéndose por lo tanto, a los beneficios que conceden los
 Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye
 la esencia del referido invento y por lo que se solicita
 Patente de Invención por 20 años, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA
 25. OBTENCIÓN DE UN POLIPEPTIDO, caracterizándose por lo siguiente:

376018

19 OCT 1972



5. 1.- Procedimiento para la obtención de un polipéptido, caracterizado porque una unidad peptida que es una sección terminal del peptido de fórmula I se une por medio de un puente de amida a una unidad peptida que es el remate de la molécula de fórmula I de manera que se consiga la secuencia de amino ácidos mostrada en la fórmula I.

10. 2.- Procedimiento para la obtención de un polipéptido, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 34 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19 OCT. 1972

SANDOZ A.G.-

J. GOMEZ ACEBO Y MODELA
p. p. Firmados L. Geste Ferrández