

380245



SECCION TECNICA

CLASIFICACION I.P.C.

CLASE C07 C07

SUBCLASE C F

PATENTE DE INVENCION

Ref: Case 100-3077. 3700/RA/HW.

Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para la obtención de derivados de polipéptidos.

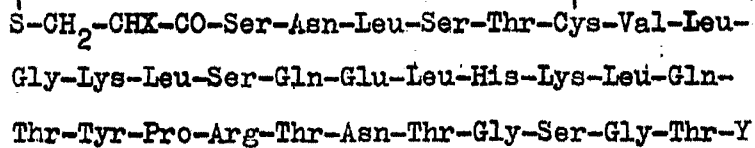
=====

Salicitante

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

=====

La presente invención se relaciona con polipéptidos o derivados de polipéptidos de fórmula general I.



I

- en donde X es -H, -NH₂, R-CO-NH-, en donde R es alquilo, aralquilo facultativamente sustituido, o arilo facultativamente sustituido, ó R'-O-CO-NH-, en donde R' no es capaz de ser disociada con ácido trifluoroacético, y es alquilo, alqueniilo, aralquilo facultativamente sustituido, o arilo facultativamente sustituido, e Y es L-prolinamida ó L-prolin-L-valinamida, teniendo la unidad de péptidos terminal S-CH₂-CHX-CO- la forma L cuando X es -NH₂, R-CO-NH- ó R'-O-CO-NH-, y en donde un radical L-serilo puede ser cambiado por un radical L-treonilo o L-alanilo, un radical L-asparaginilo por un radical L-aspartilo, L-glutaminilo o L-glutamilo, un radical L-treonilo por un radical L-serilo ó L-alanilo, un radical L-lisilo por un radical BOC-lisilo, L-ornitilo ó L-arginilo, un radical L-glutaminilo por un radical L-glutamilo, L-asparaginilo ó L-aspartilo, un radical L-glutamilo por un radical OTB-glutamilo, L-glutaminilo, L-asparaginilo ó L-aspartilo, un radical L-leucilo por un radical L-tirosilo, un radical L-tirosilo por un radical L-fenilalanilo y un radical L-arginilo por un radical L-ornitilo ó L-lisilo, o una sal de adición de ácido o un complejo de metal pesado farmacéuticamente aceptable de los mismos, y procedimientos para su producción.

- Por ejemplo, R puede significar el radical metilo, etilo, propilo o butilo terc., ó un radical fenilo o bencilo facultativamente sustituido por un átomo de halógeno, un radical alcoxi inferior o el radical nitro.

380245

- 3 -



Por ejemplo, R' puede significar el radical propilo, alilo, bencilo, p-nitrobencilo, p-clorobencilo, p-bromobencilo, p-azobencilo o p-metoxi-azobencilo.

5. Como ya se ha indicado anteriormente, en la secuencia de péptidos de fórmula I pueden cambiarse distintos aminoácidos por otros aminoácidos naturales o derivados de los mismos.

Por ejemplo,

- en las posiciones 2, 5, 13 y 29 Ser puede ser reemplazado por
Thr ó Ala,
10. en las posiciones 3 y 26 Asn puede ser reemplazado por
Asp, Gln ó Glu,
- en las posiciones 6, 21, 25, 27 y 31 Thr puede ser reemplazado por Ser ó Ala,
- en las posiciones 11 y 18 Lys puede ser reemplazado por
15. BOC-Lys, Orn ó Arg,
- en las posiciones 14 y 20 Gln puede ser reemplazado por
Glu, Asn ó Asp,
- en la posición 15 Glu puede ser reemplazado por
OTB-Glu, Gln, Asn ó Asp,
20. en la posición 19 Leu puede ser reemplazado por Tyr,
en la posición 22 Tyr puede ser reemplazado por Phe, y
en la posición 24 Arg puede ser reemplazado por Orn ó Lys.

Un compuesto de fórmula I puede producirse mediante un procedimiento que comprende el unir dos unidades de péptidos mediante un enlace de amida, siendo las unidades de péptidos de tal naturaleza que al ser unidas se obtenga la secuencia de aminoácidos del compuesto de fórmula I, y cuando se desea, el formar una sal de adición de ácido o un complejo de metal pesado farmacéuticamente aceptable del compuesto resultante.

30. Preferentemente una de las unidades de péptidos comprenden



de el grupo de fórmula II,



5. en donde X tiene el significado arriba indicado, en donde existe un puente S-S entre el aminoácido terminal y L-cisteinilo, y en donde un radical L-seriló puede cambiarse por un radical L-treonilo ó L-alanilo, un radical L-asparaginilo por un radical L-aspartilo, L-glutaminilo ó L-glutamilo, un radical L-leuciló por un radical L-tirosilo, y un radical L-treonilo por un radical L-serilo ó L-alanilo, y de preferencia el puente S-S se forma en la última etapa en la producción de la
10. unidad de péptidos.

Deberá tenerse presente que la expresión "unidad de péptidos" incluye en su significado un aminoácido único, y una pluralidad de aminoácidos unidos por enlaces de amida en forma de un péptido.

15. Las unidades de péptidos que comprenden más de dos aminoácidos pueden producirse mediante métodos generalmente conocidos para la síntesis de compuestos de este tipo, siendo posible el unir los aminoácidos en el orden deseado uno a la vez o formando primero unidades más pequeñas de péptidos y uniendo éstas a continuación. Las unidades de péptidos pueden unirse, por ejemplo, reaccionando un aminoácido o un péptido que tiene un grupo α -amino protegido y un radical carboxilo terminal activado con un aminoácido o un péptido que tiene un grupo α -amino libre y un radical carboxilo terminal protegido,
20. o reaccionando un aminoácido o un péptido que tiene un grupo α -amino activado y un radical carboxilo terminal protegido con un aminoácido o un péptido que tiene un radical carboxilo terminal libre y un grupo α -amino protegido.
- 25.

380245

- 5 -



5. El radical carboxilo puede activarse, por ejemplo, mediante conversión en una azida de ácido, anhídrido, imidazolidina, isoxazolidina ó un éster activado, o mediante reacción con una carbodiimida ó N,N'-carbonil-diimidazol. 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.

10. La introducción de un radical protector deseado en la molécula de L-hemicistina terminal del producto final puede efectuarse en cualquier etapa deseada antes de la etapa final.

15. En la etapa final de la condensación es conveniente emplear métodos que eviten o reduzcan a un mínimo la racemización, usando preferentemente el método de la azida o del éster activado, siendo conveniente efectuar la activación con N-hidroxisuccinimida.

Los grupos funcionales libres que no participan en la reacción pueden protegerse como sigue durante la síntesis de los péptidos:

20. Con referencia a la secuencia parcial B, descrita más adelante, un radical adecuado para bloquear el 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-nitrocarboboixi 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.

25. Con referencia a la secuencia parcial D, descrita más adelante, un radical adecuado para bloquear el radical γ -carboxilo es el radical butiloxi terc., pero también pueden usarse otros radicales protectores, tal como el radical metoxi,

30.



etoxi, amiloxi terc., amida o benciloxi.

5. Con referencia a la secuencia parcial C, descrita más adelante, un radical adecuado para bloquear el radical W-amino del radical lisilo es un radical carbo-alcoxi terc., de preferencia el radical carbo-butoxi terc.

10. Con referencia a las secuencias parciales EF y EF3, descritas más adelante, se usa preferentemente el radical bencilo o tritilo como radical mercapto protector. Cuando se usan radicales bencilo o tritilo para la protección de radicales SH, se suele disociarlos al final de la síntesis mediante tratamiento con sodio en amoniaco líquido. Se ha encontrado ahora que la disociación de los radicales protectores bencilo o tritilo y la formación del puente S-S en la etapa antes de la etapa final de la síntesis conducen a rendimientos particularmente altos de producto final.

15. La conversión de un radical amino o mercapto protegido en un radical libre, así como la conversión de un radical carboxilo modificado funcionalmente en un radical carboxilo libre en el transcurso del procedimiento para la producción de los polipéptidos se efectúa en la forma usual mediante tratamiento con agentes de hidrólisis o de reducción.

20. Los materiales iniciales para la producción de los polipéptidos o derivados de polipéptidos, en cuanto hayan sido desconocidos hasta ahora, pueden obtenerse mediante métodos para la síntesis de péptidos en uso actual o descritos en la literatura, pudiéndose unir los aminoácidos uno a la vez o después de la formación de unidades más pequeñas de péptidos.

25. Los polipéptidos o derivados de polipéptidos también pueden obtenerse o usarse en la forma de sus sales. Ejemplos de sales son aquellas con ácidos orgánicos, por ejemplo ácido

30.



acético, láctico, succínico, benzoico, salicílico, metanosulfónico ó toluenosulfónico, así como con ácidos poliméricos, tal como el ácido tánico o la carboximetil-celulosa, y sales con ácidos inorgánicos, tales como los ácidos halohídricos, por ejemplo ácido clorhídrico, ó ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Un ejemplo de un complejo de metal pesado es un complejo formado con cinc (ⓉⓉ).

Los compuestos producidos de acuerdo con la invención representan un importante principio terapéutico. Los compuestos reducen el contenido de calcio en el plasma y producen un balance positivo de calcio en los huesos como antagonistas de la parahormona. Ensayos biológicos efectuados con los nuevos compuestos en ratas indican un valor entre 3000 y 5000 unidades MRC por mg de péptido para la reducción del contenido de calcio en la sangre.

La dosis que se ha de aplicar depende del efecto deseado así como del modo de aplicación. Sin embargo, generalmente se obtienen resultados satisfactorios con una dosis única de 1 a 10 unidades MRC por kg de peso del cuerpo animal. Para los mamíferos más grandes la dosis diaria asciende a aprox. 70 a 700 unidades MRC, que pueden aplicarse en una dosis única ó en varias porciones. Para aplicación intramuscular una forma de aplicación adecuada contiene aprox. 70 a 700 unidades MRC de péptido como agente activo, en mezcla con un soporte líquido. Una forma de dosis única indicada adecuada comprende entre 20 y 700 unidades MRC de agente activo.

Por lo tanto, el uso de los compuestos producidos de acuerdo con la invención está indicado en el tratamiento de condiciones en las que se desea una reducción del contenido de calcio en el plasma o una influencia sobre el metabolismo



de los huesos, por ejemplo hipercalcemias producidas por deficiencia endógena de tirocalcitonina, causadas por la disfunción del tejido de la glándula tiroideas o por la hiperfunción de las glándulas paratiroides. Además, su uso está indicado en el tratamiento de enfermedades de los huesos basadas sobre una descomposición creciente, o en las que se desea una fijación de calcio en los huesos, por ejemplo osteoporosis de orígenes diversos (por ejemplo postclimacterica, posttraumática, causada por la terapia con corticosteroides o por la inactividad), fracturas, osteomalacia, raquitismo, osteodistrofia de origen renal i especialmente para una terapia combinada con calcio o fosfato.

Una ventaja de los polipéptidos o derivados de polipéptidos de fórmula I, producidos de acuerdo con la invención, en donde X es R-CO-NH- (R = alquilo, aralquilo facultativamente sustituido, arilo facultativamente sustituido) ó R'-O-CO-NH- (R' = alquilo, alquenoilo, aralquilo facultativamente sustituido, arilo facultativamente sustituido), es que estos compuestos no son afectados por la degradación de las aminopeptidasas.

Los compuestos producidos de acuerdo con la invención pueden usarse como medicamentos, por ejemplo en la forma de preparaciones farmacéuticas. Estas pueden contener dichos compuestos en mezcla con un material de soporte orgánico o inorgánico que sea adecuado para aplicación parentérica. También pueden aplicarse en forma de una preparación depósito.

Se usan las abreviaturas siguientes:

- Z = carbobenzoxi (benciloxycarbonilo)
Bzl = bencilo
BOC = butiloxi terc.-carbonilo
Trt = tritilo = trifenilmetilo

380245

- 9 -



- OTB = butiloxi terc.
ONP = éster p-nitrofenílico
OCP = 2,4,5-triclorofenoxi
OMe = metoxi
5. OEt = etoxi
NO₂ = nitro
Ser = L-serilo
Asn = L-asparaginilo
Leu = L-leucilo
10. Thr = L-treónilo
Val = L-valilo
Tyr = L-tirosilo
Arg = L-arginilo
Gln = L-glutaminilo
15. Glu = L-glutamilo
His = L-histidilo
Pro = L-prolilo
Gly = glicilo
Lys = L-lisilo
20. Cys = L-cisteinilo
Piv = pivaldilo
MCP = β -mercaptopropionilo
OSu = N-oxisuccinimida
EOC = etoxicarbonilo
25. DCHA= dicitclohexilamina

En los siguientes Ejemplos no limitativos todas las temperaturas están indicadas en grados centígrados. El valor c para la rotación óptica asciende a 1.

30. El análisis de aminoácidos en los Ejemplos siguientes mostró que los aminoácidos particulares se encuentran en las



proporciones esperadas.

Secuencia parcial A: H-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂
=====

a) H-Thr-Pro-NH₂ . ClH

5. 134 g de Z-Thr-NHNH₂ se disuelven a -5° en 2 litros de ácido clorhídrico normal y se añaden 0,55 litros de nitrito de sodio normal. Después de 5 minutos se añade carbonato de potasio hasta que la solución tenga un pH de 9, la azida resultante se extrae con etilacetato, y se añade una solución de 80 g de H-Pro-NH₂.clorhidrato en 100 cc de agua, 500 cc de
10. dimetilformamida y 77 cc de trietilamina. El etilacetato se evapora a 20° en vacío y la mezcla de la reacción se deja reposar durante la noche a 25°. La solución restante se evapora en vacío, el residuo se disuelve en etilacetato, la solución se lava con agua, ácido clorhídrico diluido y una solución
15. acuosa de carbonato de calcio, y se seca sobre sulfato de sodio. La mezcla de la reacción se concentra mediante evaporación en vacío, el residuo se disuelve en etilacetato tibio 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
20. 90.g de Z-Thr-Pro-NH₂ en 2 litros de dioxano y 260 cc de ácido clorhídrico normal, y se hidrogena a 20° y a presión normal en presencia de un catalizador de paladio. Se filtra, la solución se evapora en vacío y el residuo cristalino se lava con etilacetato, con lo cual se obtiene H-Thr-Pro-NH₂.ClH
25. con un P.F. de 216°, $[\alpha]_D^{20} = -64^\circ$ en ácido acético al 95 %.

b) Z-Ser-Gly-NHNH₂

14,5 g de Z-Ser-OH se disuelven en 100 cc de cloroformo y a la solución se le añaden 6,1 g de N-metilmorfolina; a continuación se añaden por gotas 8,2 g de éster isobutílico

380245

- 11 -



- 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 mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de la reacción se lava con amoniaco diluido, a continuación con solución de ácido clorhídrico, se seca sobre sulfato de sodio y la fase orgánica se separa mediante evaporación. El Z-Ser-Gly-OEt resultante se recrystaliza de etilacetato. P.F. 103°, $[\alpha]_D^{20} = +3^\circ$ en dimetilformamida. 19,4 g de Z-Ser-Gly-ORt se disuelven en 270 cc de etanol, se añaden 27 cc de hidrato de hidracina y la mezcla se deja reposar a temperatura ambiente durante 2 días. La masa cristalina se separa mediante filtración, se lava con metanol y se seca. Se obtiene Z-Ser-Gly-NHNH₂ con un P.F. de 180°, $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$ en dimetilformamida.
5. c) H-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂
- 25 cc de una solución 4 normal de cloruro de hidrógeno en éter etílico se añaden a 200 cc de dimetilformamida, y se disuelven en esta mezcla 11 g de Z-Ser-Gly-NHNH₂. 5,4 cc de nitrito butílico terc. se añaden seguidamente por gotas a -10° se le añaden a la solución 18 cc de trietilamina y a continuación se filtra. 12 g de H-Thr-Pro-NH₂ . ClH se disuelven simultaneamente en 100 cc de dimetilformamida, se añaden 6,2 cc de trietilamina, el clorhidrato de trietilamina precipitado se separa mediante diltración, y la solución de azida de dipéptido arriba obtenida se añade al filtrado. La mezcla de la reacción se deja reposar a 0° durante 2 horas, se evapora hasta sequedad, el residuo se disuelve en una mezcla de 500 cc de metanol y 100 cc de agua, y la solución resultante se filtra a través de una columna de 100 cc de Dowex-50 (forma H⁺). La solución se concentra mediante evaporación y el residuo se cristaliza de
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

metanol/etilacetato. Se obtiene Z-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ con un P.F. de 132° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ en dimetilformamida.

5. 22 g de Z-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ se disuelven en una mezcla de 440 cc de metanol y 88 cc de agua, y se hidrogena a 20° y a presión normal en presencia de carbón de paladio. A continuación se filtra, el filtrado se evapora hasta sequedad, el residuo se lava con éter y se seca. Se obtiene H-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ con un P.F. de 95° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -27^\circ$ en dimetilformamida.

10. Secuencia parcial B: BOC-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-NHNH₂

a) Z-Asn-Thr-Gly-OEt

15. 43 g de Z-Thr-Gly-OEt se disuelven en 500 cc de dimetilformamida, y se hidrogena a presión normal y a temperatura ambiente en presencia de carbón de paladio. Se filtra, se añaden 60 g de Z-Asn-OCP, la mezcla se deja reposar a 25° durante 16 horas, se concentra hasta aprox. 250 cc, se añade etilacetato, la mezcla de la reacción se lava con ácido clorhídrico diluido, se seca sobre sulfato de sodio y se evapora hasta sequedad. El residuo se lava con etilacetato y se seca.

20. Se obtiene Z-Asn-Thr-Gly-OEt con un P.F. de 225°, $[\alpha]_D^{20} = -4^\circ$ en dimetilformamida.

b) Z-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt

25. 29 g de Z-Asn-Thr-Gly-OEt se disuelven en 700 cc de dimetilformamida, se hidrogena a presión normal y a temperatura ambiente en presencia de carbón de paladio, se filtra, y al filtrado se le añade Z-Thr-N₃, producido de 30 g de Z-Thr-NHNH₂ [véase la secuencia parcial A, a)]. Después de dejar reposar a 0° durante 12 horas, la mezcla de la reacción se evapora hasta sequedad, el residuo se lava con agua, éter y etanol. Se obtiene Z-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt con un P.F. de 230°,

30.

380245

- 13 -



$[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ en dimetilformamida

c) BOC-Arg(NO₂)-Thr-Asn-Thr-Gly-NHNH₂

5. 22 g de Z-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt se disuelven en 700 cc de dimetilformamida, se hidrogena a presión normal y a temperatura ambiente en presencia de carbón de paladio y se filtra.
10. 23 g de BOC-Arg(NO₂)-OH se disuelven en 500 cc de dimetilacetamida, se añaden 12 cc de trietilamina, la solución se enfría, a -10°, se añaden 9,4 cc de éster isobutílico del ácido cloroformico, la mezcla se deja reaccionar durante 10 minutos, y se añade la solución de tetrapéptido arriba obtenida. Después de reposar a 25° durante 30 minutos, se añaden 100 cc de agua, la solución resultante se trata con amberlite-IRA-410 (forma OH) hasta que se obtiene una reacción negativa al cloro, se filtra y se evapora hasta sequedad. El residuo se lava con
15. cloroformo, etilacetato y éter y se seca. Se obtiene BOC-Arg(NO₂)-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt con un P.F. de ~100°, $[\alpha]_D^{20} = -4^\circ$ en dimetilformamida.
20. 12 g de BOC-Arg(NO₂)-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt se disuelven en una mezcla de 200 cc de ácido acético y 40 cc de agua, se hidrogena en presencia de carbón de paladio a 20° y a presión normal, se filtra y se evapora hasta sequedad en vacío a 20°. El residuo se disuelve en dimetilformamida y se evapora. Este tratamiento se repite hasta que ya no pueda detectarse ácido acético. El residuo se disuelve en 120 cc de dimetilformamida, se añaden 6 cc de hidrato de hidracina, la solución se deja reposar a 25° durante 16 horas, se evapora, el residuo se lava con éter, metanol/éter (1:1) y luego nuevamente con éter, y se seca. Se obtiene BOC-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-NHNH₂ con un
25. P.F. de 175° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$ en dimetilformamida/CLH
30. normal (1:1).

Secuencia parcial AB: H-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-
-NH₂

5. 13,5 g de BOC-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-NHNH₂ (secuencia parcial B) se disuelven en 270 cc de dimetilformamida/agua (8:2), se enfría a -15°, se añaden 40 cc de una solución 4 normal de ácido clorhídrico en dioxano y 2,5 cc de nitrito butílico terc. La solución se agita a -15° durante 10 minutos, se añaden 28 cc de trietilamina, se filtra, se añaden 10,5 g de H-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ (secuencia parcial A) y se agita a 0° durante 16 horas. La solución de la reacción se evapora seguidamente hasta sequedad, el residuo se lava con éter y se seca. El residuo se disuelve en metanol, se añade un décimo por volumen de agua y una cantidad 7 veces mayor de cloroformo y la solución resultante se filtra a través de una columna de 500 g de gel de sílice. Después de eluir con una cantidad creciente de metanol y de concentrar mediante evaporación, se obtiene
10. BOC-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂. Este se suspende en 200 cc de una solución 4 normal de ácido clorhídrico en dioxano y la solución se agita a 25° durante 2 horas. La solución se evapora hasta sequedad, el residuo se disuelve en ácido acético 0,2 normal, la solución se trata con amberlite-IRA-410 (forma de acetato) y la solución acuosa se liofiliza. El residuo se lava a continuación con éter, etilacetato y nuevamente con éter y se seca sobre limaduras de hidróxido de sodio. Se obtiene H-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂.
15. 2 CH₃COOH con un P.f. de 195° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -64^\circ$ en dimetilformamida/ClH normal (1:1).

Secuencia parcial C: Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH

a) H-Thr-Tyr-Pro-OH

30. 176 g de Z-Tyr(Z)-Pro-OMe se disuelven en 100 cc de me

380245



- 15 -

- tanol/ClH normal, se hidrogena en presencia de carbón de paladio a 20° y 1 atmósfera, y la solución se concentra mediante evaporación. El residuo se disuelve en 400 cc de dimetilformamida, se añaden 100 cc de trietilamina a 0°, el clorhidrato de trietilamina que cristaliza se separa mediante filtración, y se le añade al filtrado el Z-Thr-N₃ [producido de 87 g de Z-Thr-NHNH₂, véase la secuencia parcial A, a)]. La mezcla de la reacción se deja luego reposar a 0° durante 16 horas, se evapora hasta sequedad, el residuo se disuelve en etilacetato,
5. la solución se lava sucesivamente con ácido clorhídrico diluido y amoniaco diluido, se seca y se concentra mediante evaporación. El residuo se pulveriza en heptano, se lava con éter de petróleo y se seca. Se obtiene Z-Thr-Tyr-Pro-OMe con un P.F. de 80° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ en dimetilformamida.
10. 53 g de Z-Thr-Tyr-Pro-OMe se disuelven en 530 cc de metanol, se añaden 100 cc de una solución de sosa cáustica 2 normal, la solución se deja reposar a 25° durante 1 hora, se añaden 50 cc de ácido clorhídrico 2 normal, la solución se concentra hasta aprox. 200 cc, se añaden 100 cc de agua, el valor pH de la solución se ajusta a 10, la solución acuosa se lava 2 veces con etilacetato, el vapor pH de la solución se ajusta luego a 1 con ácido clorhídrico 4 normal, el tripéptido Z-Thr-Tyr-Pro-OH precipitado se extrae con etilacetato, se seca y se concentra mediante evaporación. P.F. 80°, $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ en dimetilformamida. El residuo se disuelve en una mezcla de
15. 500 cc de dioxano y 100 cc de agua y se hidrogena a 20° y a presión normal en presencia de un catalizador de paladio. Se filtra, el filtrado se evapora hasta sequedad, el residuo se lava con éter y se seca. Se obtiene H-Thr-Tyr-Pro-OH con un
20. P.F. de 180° (descomp.). $[\alpha]_D^{20} = -31^\circ$ en ácido acético al
- 25.
- 30.

95 %.

b) Z-Leu-Gln-OMe

5. 70 g de Z-Gln-OH se disuelven en 1,5 litros de dioxano y dentro de esta solución se deja fluir una solución de diazometano en éter hasta que la solución queda de color amarillo. A continuación se concentra la solución mediante evaporación y el residuo blanco se trata con éter. Se obtiene Z-Gln-OMe con un P.F. de 136°, $[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$ en dimetilformamida. 71 g del éster se disuelven en 1,7 litros de metanol.
10. A continuación se mezclan con agitación 5 g de paladio sobre carbón activo al 10 % con 59 cc de ácido clorhídrico 4 normal, y ésto se añade a la solución. Todo el material se somete a hidrogenación a temperatura ambiente y a presión normal durante tres horas, con lo cual se consume aprox. el 83 % 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 H-Gln-OMe . ClH en forma de aceite viscoso.
15. 64 g de Z-Leu-OH se disuelven en 200 cc de acetonitrilo, se añaden 27,7 g de N-hidroxisuccinimida y la solución se enfría a -10°. A esta solución se le añade una solución de 50 g de dicitclohexil-carbodiimida en 100 cc de acetonitrilo. Después de aprox. 30 minutos se separa la urea dicitclohexílica mediante filtración. Al filtrado se le añaden 47,3 g de H-Gln-OMe . ClH, disuelto en dimetilformamida, mientras se añade simultáneamente un equivalente de N-metilmorfolina. La mezcla de la reacción se deja reposar durante 4 horas y se concentra mediante evaporación. El residuo se disuelve en etilacetato y la solución se lava con una solución de bicarbonato de
20. sodio al 5 %, ácido clorhídrico normal y agua. La fase orgánica
- 25.
- 30.

380245

- 17 -

nica se seca sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación en vacío. Después de recrystalizar de metanol y éter se obtiene Z-Leu-Gln-OMe con un P.F. de 179°, $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ en dimetilformamida.

5. c) Z-Lys(BOC)-Leu-Gln-OMe

42 g de Z-Leu-Gln-OMe se disuelven en 1500 cc de metanol. A continuación se mezclan mediante agitación 16 g de paladio al 10 % sobre carbón activo con 25,8 cc de ácido clorhídrico 4 normal y éste se añade a la solución. Todo el material se somete a hidrogenación a temperatura ambiente y a presión normal durante 8 horas, con lo cual se consume el 95 %

10. de la cantidad teórica de hidrógeno. El catalizador se separa mediante filtración y el filtrado se concentra mediante evaporación. Se obtiene H-Leu-Gln-OMe . ClH en forma de una espuma. A continuación se disuelve H-Leu-Gln-OMe . ClH en 300

15. cc de dimetilformamida, y se añaden 34 g de Z-Lys(BOC)-OCP y 8,4 cc de trietilamina. Después de sacudir, la mezcla de la reacción se deja reposar durante 16 horas. A continuación la mezcla de la reacción se concentra mediante evaporación en va-

20. cío. El residuo se trata con agua y se separa del agua mediante filtración. El residuo se disuelve a continuación en una pequeña cantidad de metanol y se precipita con éter. Después de filtrar y de secar se obtiene Z-Lys(BOC)-Leu-Gln-OMe, $[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$ en dimetilformamida.

25. d) Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-NHNH₂

38 g de Z-Lys(BOC)-Leu-Gln-OMe se disuelven en 300 cc de dimetilformamida, se añaden 15 g de carbón de paladio al 10 %, se hidrogena a presión normal y a temperatura ambiente, y el catalizador se separa mediante filtración. A continuación se añade Z-His-N₃, producido de 25,2 g de Z-His-NHNH₂, la

30.



- mezcla de la reacción se deja reposar a 20° durante 5 horas, se evapora, el residuo se disuelve en acetato de etilo, la solución se lava con agua, se seca sobre sulfato de sodio, se evapora, y el residuo se lava con éter. Se obtiene Z-His-Lys-
5. (BOC)-Leu-Gln-OMe con un P.F. de 120° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ en dimetilformamida.
- 33 g de Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-OMe se disuelven en 330 cc de metanol, se añaden 7,5 cc de hidrato de hidracina, la mezcla de la reacción se deja reposar a 25° durante 2 días y a continuación se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve a continuación en dimetilformamida, se concentra mediante evaporación y este tratamiento se repite hasta que no puedan detectarse vestigios de hidracina. El residuo se lava con éter, agua y éter, y se seca, con lo cual se obtiene Z-
10. His-Lys(BOC)-Leu-Gln-NHNH₂ con un P.F. de 199°, $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ en metanol.
15. e) Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH
- 40 g de Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-NHNH₂ se disuelven en 400 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20°, se añaden 75 cc de dioxano/ClH 2 normal y a continuación se añaden 6 cc de nitrito butílico terc., la mezcla se agita a -20° durante 10 minutos, se añaden 30 cc de trietilamina y 20 g de H-Thr-Tyr-Pro-OH y la mezcla se deja reaccionar a 25° durante 16 horas. A continuación la mezcla de la reacción se evapora hasta sequedad, el residuo se lava con éter, ácido acético diluido, éter y seguidamente con etilacetato caliente. A continuación se seca en alto vacío, con lo cual se obtiene Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH con un P.F. de 215° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ en dimetilformamida.
- 20.
- 25.

380245



- 19 -

Secuencia parcial C1: Z-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH

a) H-Thr-Tyr-Pro-OH

Vease la secuencia parcial C, a).

b) Z-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH

5. 40,1 g de Z-Gln-ONP y 38,4 g de H-Thr-Tyr-Pro-OH se disuelven en 500 cc de dimetilformamida y a la solución se le añaden 12,2 cc de N-metilmorfolina. La solución se deja reposar a temperatura ambiente durante 16 horas y seguidamente se concentra completamente mediante evaporación en vacío. El residuo de la evaporación se recoge en etilacetato/n-butanol (10:1) y se lava con ácido sulfúrico normal/solución de cloruro de sodio al 30 % (1:1) y luego con solución de cloruro de sodio al 15 %. Después de secarse sobre sulfato de sodio, la fase orgánica se concentra completamente mediante evaporación en vacío. El residuo se disuelve en cloroformo/metanol (1:1) y se filtra a través de una columna de gel de sílice (cantidad 20 veces mayor). Se obtiene Z-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH en forma de espuma. $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ en dimetilformamida.
- 10.
15. c) Z-Lys(BOC)-Tyr-OMe
20. 143,9 g de Z-Lys(BOC)-OH . DCHA se disuelven en 600 cc de dimetilformamida tibia y después de enfriar la solución a 35° se añade una solución de 65,1 g de H-Tyr-OMe . ClH en 200 cc de dimetilformamida, con lo cual cristaliza cuantitativamente DCHA . ClH. Después de filtrar, se le añaden al filtrado
25. 30 g de N-hidroxisuccinimida, la mezcla se enfría a -15° y se añade una solución de 53,6 g de dicitclohexil-carbodiimida en 200 cc de acetonitrilo. La mezcla se sacude a 0° durante 15 horas, la urea dicitclohexílica se separa mediante filtración y el filtrado se concentra mediante evaporación en vacío. El
30. residuo se disuelve en etilacetato, la solución se lava con so



lución de bicarbonato de sodio al 5 %, agua, ácido sulfúrico normal y agua, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación hasta una espuma, con lo cual se obtiene Z-Lys(BOC)-Tyr-OMe, $[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$ en metanol.

5. d) Z-His-Lys(BOC)-Tyr-NHNH₂

113,5 g de Z-Lys(BOC)-Tyr-OMe se disuelven en 2 litros de metanol, se le añade a la solución una suspensión de 10 g de paladio al 10 % sobre carbón activo en 50 cc de ácido clorhídrico 4 normal y se hidrogena a temperatura ambiente y a presión normal. Después de hidrogenar durante 3 horas se ha consumido el 90 % de la cantidad teórica de hidrógeno. El catalizador se separa mediante filtración y el filtrado se concentra completamente mediante evaporación en vacío. El H-Lys(BOC)-Tyr-OMe . ClH espumoso es uniforme de acuerdo con la cromatografía de capa delgada y se une con Z-His-N₃ como sigue:

88,5 g de Z-His-NHNH₂ se disuelven en 1800 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20° , se añaden por gotas 405 cc de una solución 3,7 normal de ClH en éter y 36,6 cc de nitrito butílico terc. Después de agitar a -20° durante 10 minutos, se añaden 270 cc de trietilamina y una solución de H-Lys(BOC)-Tyr-OMe.ClH en 600 cc de dimetilformamida, conteniendo ya 27,3 cc de trietilamina. Después de 5 horas, el clorhidrato de trietilamina que cristaliza se separa mediante filtración. El filtrado se concentra completamente mediante evaporación en alto vacío. El residuo se disuelve en etilacetato/agua (2:1), la fase orgánica se lava 4 veces con una solución de cloruro de sodio al 15 %, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación. Después de disolver el residuo en cloroformo/metanol (98:2) y de filtrar sobre una columna de gel de sílice (cantidad 25 veces mayor), se

1380245



- 21 -

- obtiene Z-His-Lys(BOC)-Tyr-OMe en forma amorfa. $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ en dimetilformamida. 90,4 g de Z-His-Lys(BOC)-Tyr-OMe se disuelven en 300 cc de metanol y se añaden 20 cc de hidrato de hidracina. Después de dejar reposar durante 2 días, la hidracina resultante cristaliza. Se añaden 300 cc de éter, se filtra con succión, se lava con éter y se seca en vacío. Se obtiene Z-His-Lys(BOC)-Tyr-NHNH₂ con un P.F. de 187°, $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$ en dimetilformamida.
5. e) Z-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH
10. 36,7 g de Z-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH se disuelven en 500 cc de dimetilformamida, se añaden 15 g de paladio al 10 % sobre carbón activo, se hidrogena a temperatura ambiente y a presión normal, y a continuación se separa el catalizador mediante filtración. El filtrado contiene H-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH, el
15. que se une con Z-His-Lys(BOC)-Tyr-N₃ como sigue:
- 40,4 g de Z-His-Lys(BOC)-Tyr-NHNH₂ se disuelven en 400 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20°, se añaden 88 cc de dioxano/CLH 2 normal y a continuación se añaden 7,3 cc de nitrito butílico terc. Después de agitar a -20° durante 10 minutos, se añaden 37 cc de trietilamina y la solución de dimetilformamida conteniendo H-Gln-Thr-Tyr-Pro-OH.
20. Después de reposar a 20° durante 5 horas, la mezcla de la reacción se concentra completamente mediante evaporación en vacío, el residuo se disuelve en etilacetato/n-butanol (5:1),
25. la solución se lava con ácido acético diluido con la adición de solución de cloruro de sodio, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación. Al aceite que no ha sido concentrado completamente mediante evaporación se le añade éter, la mezcla se mezcla bien y se filtra con succión.
30. Después de secar en alto vacío, se obtiene Z-His-Lys(BOC)-Tyr-



Gln-Thr-Tyr-Pro-OH con un P.F. de 193° , $[\alpha]_D^{20} = -33^{\circ}$ en dimetilformamida.

Secuencia parcial ABC: H-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-

Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . 3

CH₃COOH

5.

10 g de heptapéptido (secuencia parcial C) se disuelven en 100 cc de dimetilformamida, la solución se concentra mediante evaporación, el residuo se disuelve en 100 cc de dimetilformamida, se añaden 15 g de N-hidroxisuccinimida, la solución se enfría a 0° , se añaden 5 g de dicitclohexil-carbodiimida, la mezcla de la reacción se deja reaccionar durante 3 horas, la urea dicitclohexílica precipitada se separa mediante filtración, el filtrado se concentra hasta 30 cc y el éster de heptapéptido-oxisuccinimida Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-

10.

15.

OSu resultante se precipita mediante la adición de éter. Después de lavar con éter, el residuo se disuelve en 100 cc de dimetilformamida, se añaden 10 g de amida de nonapéptido (secuencia parcial AB) y la mezcla se deja reaccionar durante 16 horas. Se añaden 500 cc de etilacetato y se filtra. El residuo se disuelve en dimetilformamida, se añaden 10 cc de ácido acético y se precipita nuevamente con etilacetato. Se filtra, se lava con etilacetato y éter y se seca. Se obtiene Z-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-

20.

25.

Pro-NH₂ . 2 AcOH, $[\alpha]_D^{20} = -19^{\circ}$ en dimetilformamida, y este producto se disuelve directamente en ácido acético al 80 %. A continuación se añaden 5 g de carbón de paladio y se hidrogena a presión normal y a temperatura ambiente. Se filtra, el filtrado se evapora hasta sequedad a 20° en alto vacío y el residuo se lava con éter. Después de secar sobre limaduras de

30.

hidróxido de potasio se obtiene la secuencia parcial ABC con

380245



- 23 -

un P.F. de 170° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$ en ácido acético normal.

Secuencia parcial ABC1: H-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg
-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ .

5.

3 CH₃COOH

La secuencia parcial ABC1 con un P.F. de 166° (descomp.) $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$ en ácido acético normal, se obtiene mediante un procedimiento análogo al descrito para la producción de la secuencia parcial ABC, a partir de 10 g de heptapéptido (secuencia parcial C1) y 10 g de nonapéptido (secuencia parcial AB).

10.

Secuencia parcial D: Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-
Leu-NHNH₂

a) Z-Glu(OTB)-Leu-OMe

15.

151 g de Z-Glu(OTB)-OH y 54 g de N-hidroxisuccinimida se disuelven en 700 cc de acetonitrilo y la solución se enfría a -20°. A continuación se añaden 96,5 g de dicitclohexil-carbodiimida, disueltos en 350 cc de acetonitrilo. Después de dejar reposar la solución durante aprox. 30 minutos, la

20.

urea dicitclohexílica resultante se separa mediante filtración. Al filtrado se le añaden 71,2 g de H-Leu-OMe, la mezcla se deja reposar durante 4 horas y se concentra mediante evaporación en vacío. Al residuo sólido se le añade etilacetato/agua (2:1)

25.

A continuación la fase orgánica se lava con solución de bicarbonato de sodio al 5 %, agua y ácido sulfúrico diluido (pH 3), se lava hasta neutralidad, se seca sobre sulfato de sodio y se concentra mediante evaporación. El residuo se disuelve en cloroformo conteniendo 1 % de metanol, y se filtra sobre una columna de gel de sílice (cantidad 10 veces mayor). Se obtie

30.

ne Z-Glu(OTB)-Leu-OMe con un P.F. de 31°, $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ en



dimetilformamida.

b) H-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe

5. 118 g de Z-Glu(OTB)-Leu-OMe se disuelven en 2000 cc de metanol. A continuación se mezclan 15 g de paladio al 10 % sobre carbón activo agitando con 63 cc de ácido clorhídrico 4 normal, y ésto se añade a la solución. Todo el material se somete a hidrogenación a temperatura ambiente y a presión normal durante 2 horas, con lo cual se consume aprox. el 85 % 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 H-Glu(OTB)-Leu-OMe . ClH en forma de una espuma amorfa.

10. 91,7 g de Z-Gln-ONP y 93,8 g de H-Glu(OTB)-Leu-OMe . ClH se disuelven en 500 cc de dimetilformamida, y se añaden 51 cc de N-metilmorfolina. La solución se deja reposar a temperatura ambiente durante 15 horas y a continuación se concentra completamente mediante evaporación en vacío. El residuo resultante se mezcla bien con agua y luego se separa del agua mediante filtración. A continuación se recristaliza de metanol, con lo cual se obtiene Z-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe con un P. F. de 210° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ en dimetilformamida.

15. 44,4 g de Z-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe se disuelven en 1200 cc de metanol/dimetilformamida (1:1). A continuación se mezclan 15 g de paladio al 10 % sobre carbón activo con 50 cc de agua, y ésto se añade a la solución. Después de hidrogenar durante aprox. 2 horas, se ha consumido una cantidad casi cuantitativa de hidrógeno. El catalizador se separa mediante filtración y el filtrado se concentra mediante evaporación en vacío. El residuo se disuelve en etilacetato y se lava 3 veces con una solución saturada de cloruro de sodio. La fase

20.

25.

30.

1380245



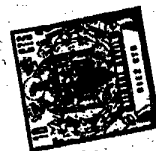
- 25 -

- orgánica se seca sobre sulfato de sodio y el filtrado se concentra mediante evaporación hasta aprox. un tercio de su volumen original. Después de la adición de éter de petróleo, el tripéptido sólido puede separarse mediante filtración. Se obtiene H-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe con un P.F. de 123°, $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ en dimetilformamida.
- 5.
- c) Z-Lys(BOC)-Leu-Ser-OMe
- 43 g de H-Leu-Ser-OMe . ClH y 80 g de Z-Lys(BOC)-OCP se disuelven en 400 cc de dimetilformamida, se añaden 22 cc de trietilamina, la solución se deja reposar a 25° durante 25 horas, la trietilamina precipitada se separa mediante filtración y el filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en etilacetato, la solución se lava con ácido clorhídrico diluido y solución diluida de bicarbonato de potasio, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra y se concentra mediante evaporación. El residuo se recristaliza de etilacetato/éter, con lo cual se obtiene Z-Lys(BOC)-Leu-Ser-OMe con un P.F. de 110°, $[\alpha]_D^{20} = -14^\circ$ en dimetilformamida.
- 10.
- 15.
- d) Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-NHNH₂
- 158 g de Trt-Gly-OH se disuelven en 2000 cc de diclorometano y 72 cc de trietilamina, la solución se enfría a -5°, se añaden 50 cc de éster etílico del ácido clorofórmico y la mezcla se agita a -5° durante 10 minutos. 300 g de Z-Lys(BOC)-Leu-Ser-OMe se disuelven simultáneamente en 3000 cc de dioxano/agua (8:2), se hidrogena a temperatura ambiente y a presión normal en presencia de carbón de paladio, se filtra y se evapora. El residuo se disuelve en cloroformo y a la solución se le añade el anhídrido mixto arriba obtenido. La solución de la reacción se deja reposar a 0° durante 1 hora, la solución de cloroformo se lava con ácido acético diluido y a con-
- 20.
- 25.
- 30.



- tinuación con solución diluida de bicarbonato de potasio, se seca y se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en 1250 cc de metanol; se añaden 175 cc de hidrato de hidracina y la mezcla de la reacción se deja reposar a 25° durante 16
5. horas. La mezcla de la reacción se concentra hasta 500 cc, se añade agua, se filtra, el residuo se lava con agua y se seca sobre pentóxido de fósforo. Se obtiene Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-NHNH₂ con un P.F. de 204°, $[\alpha]_D^{20} = -6^\circ$ en dimetilformamida.
10. e) Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-NHNH₂
 76 g de Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-NHNH₂ se disuelven en 300 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20°, se añaden 75 cc de dioxano/ClH 4 normal y a continuación se añaden 11,6 cc de nitrito butílico terc., la mezcla se agita a
15. -15° durante 10 minutos, se añaden 70 cc de trietilamina y 49,5 g de H-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe. A continuación la mezcla de la reacción se agita a 0° durante 16 horas. El clorhidrato de trietilamina precipitado se separa mediante filtración, el filtrado se concentra hasta aprox. 100 cc y al residuo se
20. le añade agua. El residuo precipitado se separa mediante filtración, se lava luego perfectamente con agua y a continuación se seca en alto vacío a 50°. El residuo se hierve con etilacetato, se lava con éter y se seca. El éster de heptapéptido Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe resultante, que
25. tiene un P.F. de 234°, $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$ en dimetilformamida, se disuelve en 200 cc de dimetilformamida, se añaden 4 cc de hidracina y la mezcla se deja reposar a 25° durante 24 horas. Después de concentrar hasta aprox. 100 cc, se añaden 500 cc de agua, el material precipitado se separa mediante filtración,
30. se lava con agua hasta que se obtiene una reacción neutra y se

380245



- 27 -

seca sobre pentóxido de fósforo a 50°. Se obtiene Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-NHNH₂ con un P.F. de 265°, $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ en dimetilformamida/agua (8:2).

Secuencia parcial ABCD: H-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-

5.

Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-

Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-

NH₂ . 3 AcOH . 3 H₂O

3 g de hidracida de heptapéptido (secuencia parcial d) se disuelven en 30 cc de dimetilformamida, la solución se en-

10.

fría a -20°, se añaden 2 cc de dioxano/CLH 4 normal y a continuación se añaden 0,3 cc de nitrito butílico terc. La mezcla de la reacción se agita a -20° durante 10 minutos, se añaden 2 cc de trietilamina y 3 g de amida de hexadecapéptido (se-

15.

cuencia parcial ABC), la mezcla se agita a 0° durante 16 horas y se evapora hasta sequedad. El residuo se lava a 0° con ácido acético diluido y a continuación con agua, se filtra, el residuo se disuelve en metanol/agua (9:1), la solución se

20.

filtra sobre gel de sílice, el residuo se evapora, se lava con etilacetato, se disuelve en 200 cc de ácido acético al 80 %, la solución se deja reposar a 25° durante 4 horas, se evapora hasta sequedad a 20°, el residuo se lava con éter, etilacetato y éter, se filtra y se seca. Se obtiene la secuencia parcial ABCD con un P.F. de 240° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -38^\circ$ en ácido acético.

25.

Secuencia parcial D1: Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-

NHNH₂

a) Z-Gln-Leu-OMe

40,1 g de Z-Gln-ONP y 19,1 g de H-Leu-OMe . CLH se disuelven en 300 cc de dimetilformamida, se añaden 34,1 cc de N-metilmorfolina y la solución se deja reposar a 20° durante

30.



15 horas sacudiendo de vez en cuando. La solución de la reacción se concentra luego completamente mediante evaporación en alto vacío. El residuo se mezcla bien con agua y se separa mediante filtración. Después de cristalizar de metanol se obtiene Z-Gln-Leu-OMe con un P.F. de 168°, $[\alpha]_D^{20} = -11^\circ$ en dimetilformamida.

b) H-Gln-Gln-Leu-OMe

27,8 g de Z-Gln-Leu-OMe se disuelven en 130 cc de ácido acético glacial y se añaden 220 cc de bromuro de hidrógeno al 40 % en ácido acético glacial. Todo el material se deja reposar durante 1 hora sacudiendo de vez en cuando. Después de concentrar completamente mediante evaporación en vacío, el residuo se pulveriza en éter anhidro. Después de filtrar el H-Gln-Leu-OMe . BrH, fuertemente higroscópico, se seca en estado húmedo por el éter a temperatura ambiente en una cámara de secado.

77,5 g de Z-Gln-ONP y 81,4 g de H-Gln-Leu-OMe . BrH se disuelven en 750 cc de dimetilformamida y se añaden 66,5 cc de N-metilmorfolina. La mezcla de la reacción se deja reposar a temperatura ambiente durante 15 horas y a continuación se concentra completamente mediante evaporación en vacío. El residuo resultante se mezcla bien con agua y se separa del agua mediante filtración. El residuo del filtro de succión se trata con acetona y se separa de la fase de acetona por medio de una prensa. Después de secar en vacío se obtiene Z-Gln-Gln-Leu-OMe con un P.F. de 238°, $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ en dimetilformamida. 54,8 g de Z-Gln-Gln-Leu-OMe se disuelven en 1200 cc de dimetilformamida. A continuación se le añade a esta solución una suspensión de 10 g de paladio al 10 % sobre carbón activo en 70 cc de agua. Después de hidrogenar a temperatura am-

380245



biente y a presión normal durante aprox. 1 hora, se ha consumido la cantidad cuantitativa de hidrógeno. El catalizador se separa mediante filtración y el filtrado se concentra completamente mediante evaporación en vacío. El residuo se recristaliza de metanol/éter. Se obtiene H-Gln-Gln-Leu-OMe con un P.F. de 151°, $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ en dimetilformamida.

5.

c) Z-Lys(BOC)-Leu-Ser-OMe

Véase la secuencia parcial D, c).

d) Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-NHNH₂

10.

Véase la secuencia parcial D, d).

e) Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-NHNH₂

Trt-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-NHNH₂ con un P.F. de 270°, $[\alpha]_D^{20} = -12^\circ$ en dimetilformamida/agua (8:2), se obtiene mediante un procedimiento análogo al descrito para la

15.

secuencia parcial D, e), reemplazándose H-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe por la misma cantidad de H-Gln-Gln-Leu-OMe.

Secuencia parcial ABCD1: H-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-

His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-

Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ .

20.

3 AcOH . 3 H₂O

La secuencia parcial ABCD1 con un P.F. de 245° (descomposición), $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ en ácido acético, se obtiene mediante un procedimiento análogo al descrito para la producción de la secuencia parcial ABCD, reemplazándose la secuencia parcial

25.

D por la misma cantidad de la secuencia parcial D1.

Secuencia parcial ABC1D: H-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-

Leu-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-

Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-

NH₂ . 3 AcOH . 3 H₂O

30.

La secuencia parcial ABC1D con un P.F. de 230° (descom-



posición), $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ$ en ácido acético, se obtiene mediante un procedimiento análogo al descrito para la producción de la secuencia parcial ABCD, reemplazándose la secuencia parcial ABC por la misma cantidad de la secuencia parcial ABC1.

- 5. Secuencia parcial ABC1D1: H-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-
His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-
Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-
NH₂ . 3 AcOH . 3 H₂O

- 10. La secuencia parcial ABC1D1 con un P.F. de 255° (descomposición), $[\alpha]_D^{20} = -41^\circ$ en ácido acético, se obtiene mediante un procedimiento análogo al descrito para la producción de la secuencia parcial ABCD, reemplazándose la secuencia parcial ABC por la misma cantidad de la secuencia parcial ABC1, y reemplazándose la secuencia parcial D por la misma cantidad de la secuencia parcial D1.

- 15. Secuencia parcial E: H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH
a) H-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe . BrH

- 20. 21,0 g de Z-Cys(Bzl)-CCP y 12,3 g de H-Val-Leu-OMe . ClH se disuelven en 120 cc de dimetilformamida. A continuación se añaden 5,9 cc de trietilamina, la mezcla de la reacción se deja reposar a 25° durante 16 horas, se añade etilacetato, se lava con ácido clorhídrico diluido, se seca sobre sulfato de sodio y se evapora hasta sequedad, y el residuo se cristaliza de etilacetato/éter 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 dietílico. Se obtiene H-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe . BrH
- 25.
- 30.

380245



con un P.F. de 168° , $[\alpha]_D^{20} = +14^{\circ}$ en dimetilformamida.

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

5. 20 g de Z-Thr-NHNH₂ se disuelven en 350 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20° , se añaden 100 cc de una solución de ácido clorhídrico 2 normal en dioxano y a continuación se añaden 10 cc de nitrito butílico terc. La mezcla de la reacción 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 resultante se sacude a 0° durante 16 horas. La mezcla de la reacción se evapora hasta sequedad, el residuo se disuelve en una mezcla de etilacetato/agua, la fase orgánica se lava con ácido clorhídrico diluido, se seca sobre sulfato de sodio, se concentra mediante evaporación, y el residuo se recristaliza de etilacetato.
10. Se obtiene Z-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe con un P.F. de 208° , $[\alpha]_D^{20} = -27^{\circ}$ en dimetilformamida.

15. 20 g del tetrapéptido arriba obtenido se disuelven en 200 cc de una mezcla de ácido trifluoroacético/etilacetato (1:1), y se pasa una corriente de bromuro de hidrógeno gaseoso a través de la solución a 0° durante 1 hora, la solución se concentra luego mediante evaporación y el residuo se recristaliza de metanol/éter dietílico. Se obtiene H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe . 1,3 BrH con un P.F. de 202° , $[\alpha]_D^{20} = -10^{\circ}$ en dimetilformamida.

25. c) H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH

30. 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 de sosa cáustica 2 normal, la mezcla se deja reposar a 25° durante 1 hora, se añaden 240 cc de ácido acético glacial y la mezcla se deja reposar a 0° durante 2 horas. La masa



cristalina precipitada se separa mediante filtración, se lava primero con ácido acético normal y a continuación con agua y se seca a 50° en alto vacío. Se obtiene H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH con un P.F. de 219°, $[\alpha]_D^{20} = -53^\circ$ en amoniaco normal.

5. Secuencia parcial F: BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂

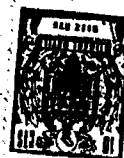
a) H-Asn-Leu-Ser-OMe . ClH

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 trietilamina, la solución se deja reposar a 25° durante 16 ho-
10. ras, se evapora hasta sequedad y el residuo se recristaliza de metanol. Se obtiene 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 solución 4 normal de ácido clorhídrico en metanol. La solución se deja reposar a 25° durante
15. 1 hora, se evapora hasta sequedad, el residuo se disuelve en metanol y se precipita con éter dietílico. Se obtiene H-Asn-Leu-Ser-OMe . ClH con un P.F. de 180°, $[\alpha]_D^{20} = -23^\circ$ en dimetilformamida.

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

39,5 g de BOC-Ser-NHNH₂ se disuelven en 500 cc de dime-
20. tilformamida, 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. Después de dejar reposar la mezcla de la reacción a -20° durante
25. 10 minutos, se añaden 90 cc de trietilamina y 38,0 g de H-Asn-Leu-Ser-OMe . ClH, la mezcla se agita a 0° durante 16 horas, se evapora hasta sequedad y el residuo se recristaliza de clo-
roformo/éter dietílico. Se obtiene BOC-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe .
30. con un P.F. de 135°, $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ en dimetilformamida y este producto se disuelve en 420 cc de una solución 4 normal de áci-

380245



- 33 -

- do clorhídrico en metanol. La solución se deja reposar a 25° durante 1 hora, se evapora hasta sequedad y el residuo se recristaliza de metanol/etilacetato, Se obtiene H-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe . ClH con un P.F. de 155° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ en dimetilformamida.
5. c) BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂
- 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 mezcla de la reacción se deja reposar a 25° durante 16 horas, se evapora hasta sequedad y el residuo se recristaliza de metanol. Se obtiene 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 el BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂ resultante, con un P.F. de 224°, $[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$ en dimetilformamida, se seca.
15. Secuencia parcial EF: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH
- 18,4 g de BOC-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂ (secuencia parcial F) se disuelven en 150 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20° y se añaden 40 cc de una solución 2 normal de ácido clorhídrico en dioxano y 15 cc de nitrito butílico terc. Después de dejar reposar la mezcla de la reacción a -20° durante 10 minutos, se añaden 28 cc de trietilamina y 16,2 g de H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH (secuencia parcial E) y la mezcla se agita a 25° durante 16 horas. A conti
20. 25. 30.



5. nuación se filtra, la solución se concentra mediante evaporación y el residuo se lava perfectamente 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.

10. 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 oscuro. Se añade cloruro de amonio con fines de descolorimiento. 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-Cys-Val-Leu-OH con un P.F. de 248° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -41^{\circ}$ en dimetilformamida/agua (3:1).

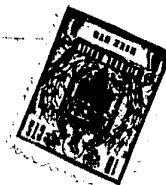
15. El nonapéptido resultante se disuelve en 5000 cc de amoníaco 0,01 normal, se añade peróxido de hidrógeno normal con agitación hasta que se obtiene una reacción negativa al nitroprusiato, se añaden 200 cc de ácido acético glacial, se filtra y se liofiliza. Se obtiene BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH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

20. Secuencia parcial EF1: Piv-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-
 =====
Leu-OH

25. BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH (secuencia parcial EF) se disuelve en 300 cc de ácido trifluoroacético, la solución se deja reposar a 25° durante 30 minutos, se evapora, el residuo se lava con etilacetato y se disuelve en 300 cc de dimetilformamida. A esta solución se le añaden 30 g de éster p-nitrofenílico del ácido piválico, producto en la forma descrita a continuación, así como 14 cc de trietilamina, la

30.

380245



- 35 -

- mezcla se deja reposar a 25° durante 16 horas, se evapora, y el residuo se lava con cloroformo. El residuo se disuelve en 300 cc de dimetilformamida, se añaden 50 cc de agua y 50 g de Dowex-50, se agita durante 15 minutos, se filtra, la resina se
5. lava con dimetilformamida y el filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se lava con cloroformo y a continuación con etilacetato y se seca. Se obtiene Piv-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH con un P.F. de 243°, $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ en dimetilformamida/agua (3:1).
10. Ester p-nitrofenílico del ácido piválico
95 g de ácido piválico y 131 g de p-nitrofenol se disuelven en 1000 cc de etilacetato, se añaden 197 g de dicitlohexil-carbodiimida, la mezcla se agita a 25° durante 2 horas, se filtra, el filtrado se concentra mediante evaporación y el
15. residuo se recristaliza de una mezcla de etilacetato/éter de petróleo. Se obtiene el éster p-nitrofenílico del ácido piválico con un P.F. de 104°.
- Secuencia parcial EF2: EOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-
Leu-OH
20. La secuencia parcial EF2 se obtiene mediante un procedimiento análogo al descrito para la producción de la secuencia parcial EF1, excepto que se usan como materiales iniciales la secuencia parcial EF y el éster p-nitrofenil-etílico del ácido carbónico, producido en la forma descrita a continuación.
25. P.F. 263°, $[\alpha]_D^{20} = -21^\circ$ en dimetilformamida/agua (3:1).
Ester p-nitrofenil-etílico del ácido carbónico
200 g de p-nitrofenol y 113 cc de piridina se disuelven en 1200 cc de etilacetato, la solución se enfría a 0°, se añaden 156 cc de éster etílico del ácido clorofórmico con agi-
30. tación, la mezcla se agita a 0° durante 30 minutos más, se la



va con agua, se seca sobre sulfato de sodio y se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en éter dietílico y el éster p-nitrofenil-etílico del ácido carbónico se cristaliza mediante la adición de éter de petróleo. P.F. 65°.

5. Secuencia parcial F3: Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂

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

Véase la secuencia parcial F, a).

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

Véase la secuencia parcial F, b).

10. c) Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂

Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂ con un P.F. de 251°.

$[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ en dimetilformamida, se obtiene mediante un procedimiento análogo al descrito para la producción de la secuencia parcial F, c), excepto que se usa como material inicial

15. 18,5 g de H-Ser-Asn-Leu-Ser-OMe . ClH y 13,5 g de Bzl-MCP-OMP.

Secuencia parcial EF3: MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-NHNH₂

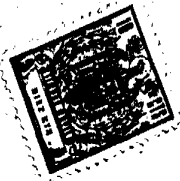
16,2 g de Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-NHNH₂ (secuencia parcial F3) se disuelven en 150 cc de dimetilformamida, la solución se enfría a -20°, se añaden 40 cc de una solución 2 normal de ácido clorhídrico en dioxano y 15 cc de nitrato butílico terc. La solución se deja reposar a -20° durante 10 minutos, después de lo cual se añaden 28 cc de trietilamina y 21,8 g de H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe . 1,3 BrH [secuencia parcial E, b)] y la mezcla se agita a 25° durante 16 horas. A continuación se filtra, la solución se concentra mediante evaporación y el residuo se lava perfectamente con metanol caliente.

25.

Se obtiene Bzl-MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OMe con un P.F. de 244°, $[\alpha]_D^{20} = -22^\circ$ en dimetilformamida, y este producto se disuelve a 60° en 100 cc de dimetilformamida.

30.

1380245



- 37 -

5. Se añaden 10 cc de hidrato de hidracina y la solución se deja reposar a 60° durante 2 horas. La hidracida de nonapéptido resultante cristaliza. Se lava con éter dietílico, agua y metanol y se seca sobre pentóxido de fósforo en alto vacío. Se obtiene la hidracida de nonapéptido con un P.F. de 265°, $[\alpha]_D^{20} = -35^\circ$ en dimetilformamida/agua (3:1).

10. 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 oscuro. Se añade cloruro de amonio con fines de descolorimiento y a continuación se pasa una corriente de aire a través de la solución hasta que se obtiene una reacción negativa al nitroprusiato. La solución se evapora hasta sequedad y el residuo se lava con agua y acetona. Después de secar se obtiene

15. MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-NHNH₂ con un P.F. de 278°, $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ$ en dimetilformamida/agua (3:1).

20. EJEMPLO 1: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . 2 CH₃COOH . 3 H₂O

25. 1,0 g de nonapéptido (secuencia parcial EF) se disuelve en 10 cc de dimetilformamida, se añaden 1,5 g de N-hidroxisuccinimida y 0,52 g de dicitclohexil-carbodiimida, la mezcla se agita a 25° durante 6 horas, se filtra y el filtrado se evapora hasta sequedad. El residuo se lava con etilacetato y éter dietílico y se seca. Se obtiene BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OSu con un P.F. de 242°, y este producto se disuelve en 10 cc de dimetilformamida. A esta solución se le añaden 3,1 g de diacetato de tricosapéptido (secuencia parcial ABCD) y 1,2 g de N-hidroxisuccinimida y la mezcla se agi

30.



- ta a 25° durante 16 horas. La mezcla de la reacción 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 en capas sobre una columna de gel de sílice (5 x 100 cm), que ha sido equilibrada con la mezcla arriba indicada. Se eluye 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 el compuesto del título con un P.F. de 230° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$ en ácido acético al 50 %.

15. EJEMPLO 2: H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . hexaacetato. decahidrato

20. 3,3 g de dotriacontapéptido . diacetato . trihidrato protegido (Ejemplo 1) se disuelven bajo una atmósfera de nitrógeno en 100 cc de ácido trifluoroacético, la solución se deja reposar a 20° durante 15 minutos y 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, el residuo se lava con éter dietílico y se seca sobre hidróxido de potasio en alto vacío. Se obtiene el compuesto del título con un P.F. de 220° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$ en ácido acético al 50 %.

25. Los compuestos siguientes se producen mediante un procedimiento análogo al descrito en el Ejemplo 1 ó 2:

30. EJEMPLO 3: Piv-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-

380245



(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln
-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-
NH₂ . diacetato . trihidrato

Materiales iniciales: secuencias parciales EF1 y ABCD.

5. Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 1.

P.F. 220° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$ en ácido acético al 50 %.

EJEMPLO 4: Piv-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-
Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-
Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . hexaace-
tato . octahidrato

10.

Material inicial: dotriacontapéptido del Ejemplo 3.

Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 2.

P.F. 216° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -49^\circ$ en ácido acético al 50%.

EJEMPLO 5: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-
(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-
Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-
Pro-NH₂ . diacetato . trihidrato

15.

Materiales iniciales: secuencias parciales EF2 y ABCD.

Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 1.

20. P.F. 230° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -45^\circ$ en ácido acético al 50%.

EJEMPLO 6: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-
Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-
Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . hexaace-
tato . octahidrato

25.

Material inicial: dotriacontapéptido del Ejemplo 5.

Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 2.

P.F. 240° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -52^\circ$ en ácido acético al 50%.

EJEMPLO 7: MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys(BOC)-
Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-
Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ .
diacetato . trihidrato

30.

POOR
QUALITY



- 1,05 g de hidracida de octapéptido (secuencia parcial EF3) se disuelven a -20° en una mezcla de 50 cc de dimetilformamida y 1,2 cc de dioxano/ ClH_2 normal. Se añaden 0,116 cc de nitrito butílico terc., se agita durante 10 minutos a -20° , se añaden 1,4 cc de trietilamina y 3,1 g de diacetato de tri-cosapéptido (secuencia parcial ABCD) y 5 cc de agua y se agita durante 16 horas a 0° . La mezcla de la reacción se evapora hasta sequedad y el residuo se lava con éter dietílico, cloroformo y acetona. El péptido bruto resultante se disuelve en 100 cc de ácido acético 0,3 normal, se trata con 20 cc de amberlite-IRA-410 (acetato) y se añaden 50 cc de hidróxido de amonio 0,6 normal. El valor pH se ajusta a 6,5 y la solución resultante se coloca en una columna de carboximetil-celulosa (10 x 100 cm) que ha sido tratada con una solución reguladora de acetato de amonio 0,15 normal. La elución se efectúa con una concentración y un gradiente pH crecientes (0,15 normal a 0,4 normal; pH 6,5 a pH 7,0). Las fracciones combinadas que contienen el péptido puro se liofilizan 3 veces, el residuo se lava con etanol y seguidamente con éter dietílico y se seca sobre hidróxido de potasio en alto vacío. Se obtiene el compuesto del título con un P.F. de 230° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -45^{\circ}$ en ácido acético al 50 %.

25. EJEMPLO 8: MCP-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . hexaacetato octahidrato

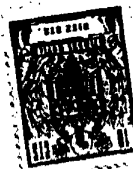
Material inicial: dotriacontapéptido del Ejemplo 7.

Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 2.

P.F. 220° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -60^{\circ}$ en ácido acético al 50%.

30. EJEMPLO 9: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-

380245



- 41 -

(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-His-Lys(BOC)-Leu-Gln-Thr-
Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . 2
CH₃COOH . 3 H₂O

Materiales iniciales: secuencias parciales EF y ABCDL.

5. Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 1.

P.F. 235° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ en ácido acético al 50%.

EJEMPLO 10: H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-
Ser-Gln-Gln-Leu-His-Lys-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-
Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . 6 CH₃COOH .
10 H₂O

10.

Material inicial: dotriacontapéptido del Ejemplo 9.

Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 2.

P.F. 230° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -8^\circ$ en ácido acético al 50%.

EJEMPLO 11: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-
(BOC)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(BOC)-Tyr-
Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-
Pro-NH₂ . 2 CH₃COOH . 3 H₂O

15.

Materiales iniciales: secuencias parciales EF y ABCLD.

Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 1.

20. P.F. 230° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ en ácido acético al 50%.

EJEMPLO 12: H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-
Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-
Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . hexaacetato.
decahidrato

25.

Material inicial: dotriacontapéptido del Ejemplo 11.

Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 2.

P.F. 216° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$ en ácido acético al 50%.

EJEMPLO 13: BOC-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-
(BOC)-Leu-Ser-Gln-Gln-Leu-His-Lys(BOC)-Tyr-Gln-
Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . di-
acetato . trihidrato

30.

POOR
QUALITY



Materiales iniciales: secuencias parciales EF y ABCIDL.

Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 1.

P.F. 235° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ en ácido acético normal/
metanol (2:1).

5. EJEMPLO 14: H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-
Ser-Gln-Gln-Leu-His-Lys-Tyr-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-
Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂ . hexaaceta-
to . decahidrato

Material inicial: dotriacontapéptido del Ejemplo 13.

10. Procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 2.

P.F. 216° (descomp.), $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ en ácido acético normal.

- N C T A -

15. Descrita suficientemente la naturaleza del invento,
así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacer-
se constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son
susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alte-
ren su principio fundamental. También se hace constar que el
invento corresponde a once Solicitudes de Patente, presenta-
das en Suiza, nos: 8.405/69 de 3 de junio de 1969; 9.451/69
20. de 20 de junio de 1969; 9.452/69 de 20 de junio de 1969;
9.453/69 de 20 de junio de 1969; 9.461/69 de 20 de junio de
1969; 9.559/69 de 23 de junio de 1969; 9.560/69 de 23 de ju-
nio de 1969; 9.561/69 de 23 de junio de 1969; 9.792/69 de
26 de junio de 1969; 9.957/69 de 30 de junio de 1969; y
25. 13.612/69 de 9 de septiembre de 1969, acogiéndose por lo tan-
to a los beneficios que conceder los Convenios Internaciona-
les en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referi-
do invento y por lo que se solicita Patente de Invención por
20 años en España, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE
30. DERIVADOS DE POLIPEPTIDOS; caracterizándose por lo siguiente:

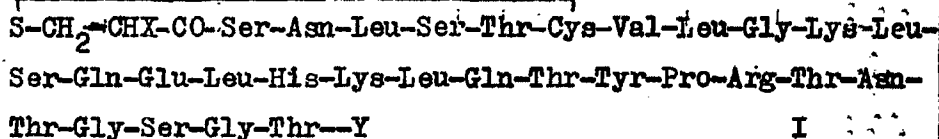
py

380245



- 43 -

1.- Procedimiento para la obtención de derivados de polipéptidos, de fórmula I,



5. en don X es -H, -NH₂, R-CO-NH-, en donde R es alquilo, aralquilo facultativamente sustituido, o arilo facultativamente sustituido, ó R'-O-CO-NH-, en donde R' no es capaz de ser disociada con ácido trifluoroacético, y es alquilo, alquencilo, aralquilo facultativamente sustituido, o arilo facultativamente sustituido, e Y es L-prolinamida ó L-prolin-L-valinamida, teniendo la unidad de péptidos terminal S-CH₂-CHX-CO- la forma L cuando X es -NH₂, R-CO-NH- ó R'-O-CO-NH-, y en donde un radical L-serilo puede ser cambiado por un radical L-treonilo ó L-alanilo, un radical L-asparaginilo por un radical L-aspartilo, L-glutaminilo ó L-glutamilo, un radical L-treonilo por un radical L-serilo ó L-alanilo, un radical L-lisilo por un radical BOC-lisilo, L-ornitilo ó L-arginilo, un radical L-glutaminilo por un radical L-glutamilo, L-asparaginilo ó L-aspartilo, un radical L-glutamilo por un radical OTB-glutamilo, L-glutaminilo, L-asparaginilo ó L-aspartilo, un radical L-leucilo por un radical L-tirosilo, un radical L-tirosilo por un radical L-fenilalanilo y un radical L-arginilo por un radical L-ornitilo ó L-lisilo, caracterizado porque se unen dos unidades de péptidos mediante un enlace de amida, siendo las unidades de péptidos de tal naturaleza que al ser unidas se obtenga la secuencia de aminoácidos del compuesto de fórmula I, uniendo ambas unidades de péptidos, preferentemente un nonapéptido que contiene el enlace disultido, y un tricosapéptido de modo químico anteriormente conocido.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.
- ky

'380245



- 44 -

2.- Procedimiento para la obtención de derivados de polipéptidos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de cuarenta y cuatro hojas escritas a máquina por una sola cara.

5.

Madrid,

SANDOZ A.G.

GOMEZ ACEDO Y RUDET
p. p. Firmado: L. Gato Fernández

Rg