

P. - 46.290

Case No F-1759 E

Takeda's Case No

59.478

SECCION TECNICA

CLASIFICACION I. P. C

CLASE C 07 A 61

SUBCLASE C K

385407

Memoria descriptiva



para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

entidad / de nacionalidad japonesa

con domicilio en 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka,
Japón

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA FABRICACION DE UN POLIPÉPTI-
DO"

(Clase Internacional C07c)

=====

7.12.70.

385407



La presente Invención se refiere a nuevos polipéptidos y a un Procedimiento para su fabricación. Más concretamente, la presente Invención se refiere a polipéptidos relacionados con la hormona Adrenocorticotrópica, así como a un procedimiento industrialmente practicable para su fabricación.

En el esquema y en toda la Memoria Descriptiva presente y ejemplos de trabajo, Sar, Albu, Tir, Ser, Met, Glu, His, Fe, Arg, Tri, Gli, Lis, Pro, y Val, representan restos de sarcosina, ácido α -amino isobutírico, L-tirosina, L-serina, L-metionina, ácido L-glutámico, L-histidina, L-fenilalanina, L-arginina, L-triptófano, glicina, L-lisina, L-prolina y L-valina, respectivamente y la palabra "resto" antes mencionada, significa un radical que deriva del α -amino ácido correspondiente por eliminación del grupo OH del grupo carboxilo y de H del grupo α -amino, es decir, comenzando con referencia a la L-lisina $(\text{CH}_2(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3\text{CHNH}_2\text{COOH})$ por ejemplo, cuando la L-lisina se representa mediante la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-COOH}(\text{NH}_2$ es un radical α -amino), se cita, como "residuo de L-lisina" un radical de -NH-A-CO- y se representa abreviadamente como "Lis"; las abreviaturas para los otros α -amino ácidos antes mencionados, tienen el mismo significado que el indicado en la L-lisina.

La presente Invención proporciona un polipéptido seleccionado del grupo constituido por un compuesto polipeptídico, indicado mediante la fórmula general (I):

X-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-P (donde X representa sarcosilo o α -amino-isobutirilo, y P es un miembro seleccionado del

30
7.12.70.



grupo constituido por ProOH, Pro-ValOH, Pro-Val-LisOH, Pro-Val-Lis-ValOH, Pro-Val-Lis-Val-TirOH y Pro-Val-Lis-Val-Tir-ProOH, su amida sin sustituir, su sal de adición de ácido, fisiológicamente tolerable, y su complejo de metal pesado. A lo largo de toda la Memoria Descriptiva presente, los ejemplos de trabajo y las reivindicaciones, la expresión "amida sin sustituir" se entiende significa "un polipéptido del que está aminado el grupo carboxilo del C terminal, es decir, convertido en $-\text{CONH}_2$ "

5
10 Los productos finales de la presente Invención, son nuevos polipéptidos, y su actividad adrenocorticotrófica les hace sumamente adecuados para su empleo como medicinas o drogas para veterinaria. Los compuestos complejos metálicos de los péptidos, en particular, sobresalen en la duración de la eficacia así como en su escasa solubilidad. Los compuestos de la presente Invención pueden ser útiles, asimismo, como intermedios para la producción de medicamentos que tienen una cadena de amino ácidos, más larga.

15
20 Los nuevos polipéptidos se obtienen mediante el método conocido para la fabricación, para cuyo propósito los amino ácidos pueden enlazarse en el orden de sucesión antes indicado. Es decir, los polipéptidos de la presente Invención se producen dejando reaccionar sarcosina, ácido α -amino-isobutírico o un fragmento peptídico que
25 contiene X en el orden de sucesión antes indicado (donde el grupo carboxilo del C-terminal está activado) con un fragmento polipeptídico que corresponde al resto de la sucesión de aminoácidos antes descrita, a la vez que los
30 grupos funcionales que no participan en la reacción, se

7.12.70.

385407



Protegen ventajosamente.

5 El grupo carboxilo del C terminal de la sarcosina, del ácido α -amino-isobutírico o de un fragmento peptídico que contiene X, puede activarse, por ejemplo, mediante la formación de un anhídrido de ácido, mediante la formación de un anhídrido mixto por reacción con un derivado de un ácido orgánico con impedimento estérico, por ejemplo cloruro de pivaloilo, o con un derivado de ácido carbónico, por ejemplo el cloroformiato de etilo, o puede
10 activarse mediante la formación de un éster activo, por ejemplo un éster nitrofenílico, por ejemplo el éster p-nitrofenílico, o un éster fenílico clorado, por ejemplo, el éster pentaclorofenílico y el éster, 2,4,5-triclorofenílico, o mediante la formación de una azida, o mediante el
15 empleo de un agente de condensación, por ejemplo N,N'-diciclohexil-carbodiimida o N,N'-carbonil-bis-imidazol.

20 Cualesquiera grupos funcionales libres que no participen en la reacción se protegen, convenientemente, en especial por radicales que son fáciles de eliminar por hidrólisis o reducción.

25 Así pues, para el grupo α -amino del N terminal de la L-sarcosina o del ácido α -amino-isobutírico, se recomiendan sustituyentes protectores tales como grupo benciloxicarbonilo, grupo butoxicarbonilo terciario, grupo amiloxicarbonilo terciario, p-metoxifenilsulfonilo o semejantes. Entre ellos, el grupo benciloxicarbonilo y el grupo butoxicarbonilo terciario son los más preferidos para este propósito.

30 El sustituyente protector para proteger el grupo ϵ -amino de la L-lisina, se pone de ejemplo por benci-
7.12.70.



loxycarbonilo, butoxycarbonilo terciario, clorobenciloxi-
carbonilo o semejantes, y los más preferibles son bencilo-
xicarbonilo y butoxycarbonilo terciario.

5 El grupo carboxilo del C terminal de "un frag-
mento polipeptídico que corresponde al resto de la suce-
sión de amino ácidos" antes mencionado, puede protegerse
mediante sustituyentes protectores conocidos per se, que
incluyen grupos alcoholilo inferiores (por ejemplo metilo,
10 butilo terciario) y grupos aralcoholilo (por ejemplo, benci-
lo).

El sustituyente protector para proteger el
grupo guanidino de la L-arginina, incluye grupos nitro,
grupos torilo o semejantes, y el primero es el más prefe-
rible. El grupo guanidino de la L-arginina puede proteger
15 se mediante la adición de cloruro de hidrógeno al grupo
guanidino.

Para proteger el grupo γ -amino del ácido
L-glutámico, pueden utilizarse sustituyentes protectores
tales como butilo terciario, bencilo y semejantes, pero
20 el grupo γ -carboxilo del ácido L-glutámico o el grupo
guanidino de la L-arginina, pueden quedar sin proteger
durante la reacción.

Los polipéptidos obtenidos mediante la reac-
ción de condensación, generalmente tienen grupos amino
25 protegidos y grupos carboxilo protegidos, en su molécula.
La conversión de un grupo amino protegido en un grupo li-
bre y la conversión de un grupo carboxilo protegido en un
grupo carboxilo libre, se lleva a cabo de la manera cono-
cida, por tratamiento con un agente hidrolizante (por
30 ejemplo, fluoruro de hidrógeno, ácido trifluoroacético,
7.12.70.

385407



etc.) o un agente reductor (por ejemplo sodio metálico en presencia de amoníaco líquido, o semejante).

5 Todos los métodos mencionados pueden emplearse para formar uniones peptídicas, según la presente Invención, pero los procedimientos utilizados en los Ejemplos que siguen, son especialmente ventajosos.

10 Según se ha indicado anteriormente, existen diversas posibilidades disponibles para sintetizar los polipéptidos de la presente Invención. Según uno de los procedimientos, por ejemplo, un derivado protegido de un tri péptido, de fórmula: X-Tir-SerOH (donde X tiene el mismo significado antes expuesto, el grupo carboxilo del C terminal de la L-serina está activado, y el grupo funcional libre que no participa en la reacción, está protegido) se
15 condensa con un miembro seleccionado del grupo constituido por un derivado protegido de un polipéptido, de fórmula:

20 H-Met-Glu-His-Fe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-P'-NH₂ (en la que P' es un miembro seleccionado del grupo constituido por ProOH, Pro-ValOH, Pro-Val-LisOH, Pro-Val-Lis-ValOH, Pro-Val-Lis-Val-TirOH y Pro-Val-Lis-Val-Tir-ProOH y todos los grupos funcionales que no participan en la reacción, están protegidos), su amida sin sustituir y una sal de adición de ácido correspondiente, y los sustituyentes protectores se eliminan.
25

30 En este procedimiento, es preferible que el grupo carboxilo del C terminal de la L-serina, se activa mediante la formación de un éster activo, mediante la formación de una azida o mediante el empleo de un agente de condensación y, después de la reacción de condensación,
7.12.70.

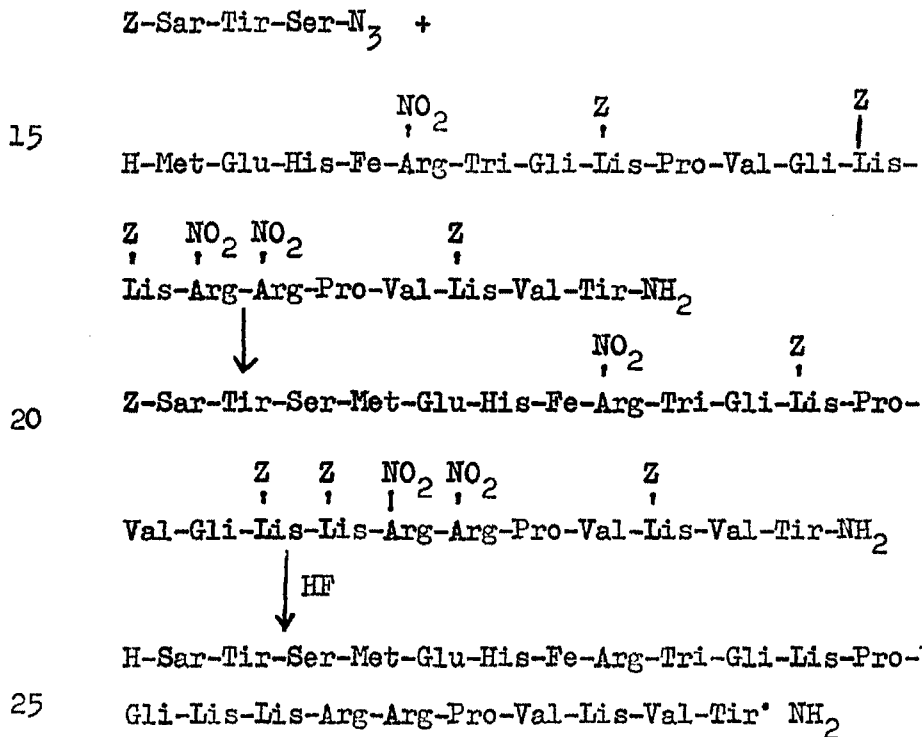


los grupos amino y carboxilo protegidos, del condensado así producido, se liberan mediante el empleo de fluoruro de hidrógeno.

5 Según este procedimiento se obtiene un trico-
sapéptido de la presente Invención, conforme a la Tabla 1,
como se indica a continuación.

En toda esta Memoria Descriptiva, los símbo-
los Z y BOC, representan grupo carbobenciloxi y grupo bu-
toxicarbonilo terciario, respectivamente, y OtBu represen-
10 ta el grupo γ -carboxilo del ácido L-glutámico, protegido
por el grupo butilo terciario.

Tabla 1



En la Tabla 1, X tiene el mismo significado
anteriormente expuesto. El derivado tripeptídico mostrado
en la Tabla 1, puede prepararse por ejemplo, mediante la
ruta de síntesis expuesta en la Tabla 2, y el heneicosa-
péptido puede prepararse, por ejemplo, mediante el método

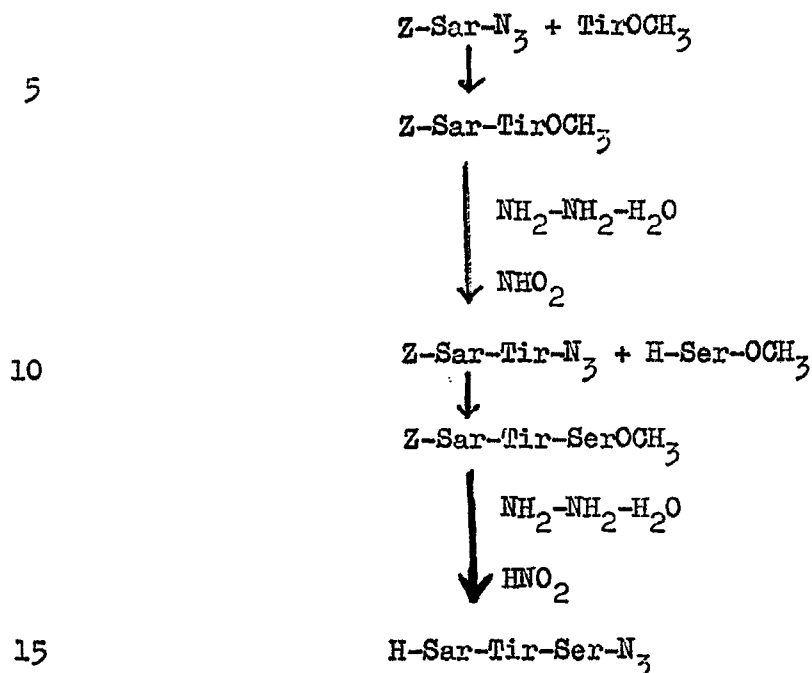
30
7.12.70.

385407



descrito en la Solicitud de Patente Holandesa Nº 18811/
1968.

Tabla 2



Los compuestos polipeptídicos de esta Inven-
ción, pueden prepararse, también, mediante la reacción de
condensación entre un derivado protegido de un tetrapépti-
do, de fórmula: X-Tir-Ser-Met (donde X tiene el mismo sig-
nificado antes expuesto, el grupo funcional libre que no
participa en la reacción está protegido y el grupo carboxi-
lo del C terminal de la L-metionina, está activado) y
un miembro seleccionado del grupo constituido por un deri-
vado protegido de un polipéptido de H-Glu-His-Fe-Arg-Tri-
Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-P'

(donde P' tiene el mismo significado anteriormente expues-
to, y están protegidos todos los grupos funcionales que
no participan en la reacción), su amida sin sustituir y
una sal de adición de ácido correspondiente, y después se
liberan los grupos amino y carboxilo protegidos. Como es

30
7.12.70.

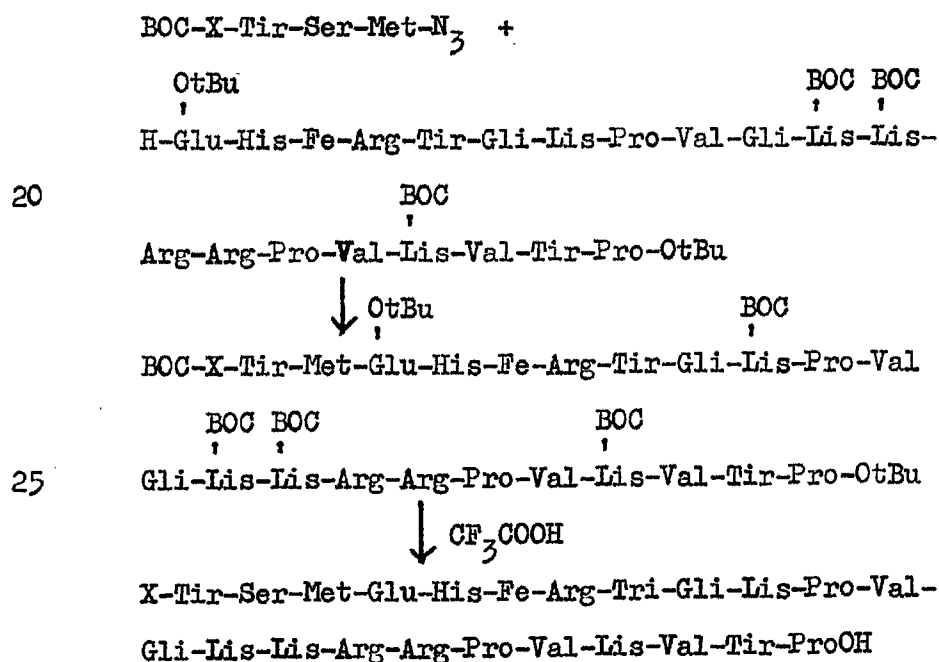


lógico, el polipéptido libre resultante puede convertirse en una sal de adición de ácido, fisiológicamente tolerable, o en un complejo de metal pesado.

5 En este procedimiento, es preferible que el grupo carboxilo del C terminal de la L-metionina se active mediante la formación de un éster activo, mediante la formación de una azida o mediante el empleo de un agente de condensación, y, después de la reacción de condensación, los grupos amino y carboxilo protegidos, del polipéptido así producido, se liberan, mediante el empleo de ácido trifluoroacético o mediante el empleo de fluoruro de hidrógeno.

15 Según este procedimiento se obtiene un tetra-cosapéptido de la presente Invención, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3



25 (En la tabla anterior, Pro-OtBu representa que el grupo carboxilo está esterificado mediante un grupo butilo ter-

30
7.12.70.

385407



ciario).

Según el método de la presente Invención, puede producirse también un polipéptido, dejando reaccionar un derivado protegido de un decapeptido, de fórmula:

5 X-Tir-Ser-Met-Glu-His-Pe-Arg-Tri-GliOH (en la que X tiene el mismo significado anteriormente expuesto), los grupos funcionales libres que no participan en la reacción están protegidos por sustituyentes protectores y el grupo carboxilo del C terminal de la glicina está activado) con un
10 miembro seleccionado del grupo constituido por un derivado protegido de un polipéptido de fórmula: H-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-P' (donde P' es un miembro seleccionado del grupo constituido por ProOH, Pro-ValOH, Pro-Val-LisOH, Pro-Val-Lis-ValOH, Pro-Val-Lis-Val-TirOH y Pro-Val-Lis-Val-Tir-ProOH, y todos los grupos funcionales que no participan en la reacción, están protegidos por sustituyentes protectores), su amida sin sustituir y una sal de adición de ácido correspondiente, y separando los grupos protectores del polipéptido así obtenido.

20 En este procedimiento, es preferible que el grupo carboxilo del C-terminal de la glicina, se active mediante la formación de un éster activo, mediante la formación de una azida, mediante el empleo de un agente de condensación, mediante la formación de un anhídrido de ácido, activo, o mediante la formación de un anhídrido mixto;
25 después de la reacción de condensación los grupos amino y carboxilo protegidos, así obtenidos, se liberan mediante el empleo de ácido trifluoroacético o mediante el empleo de fluoruro de hidrógeno.

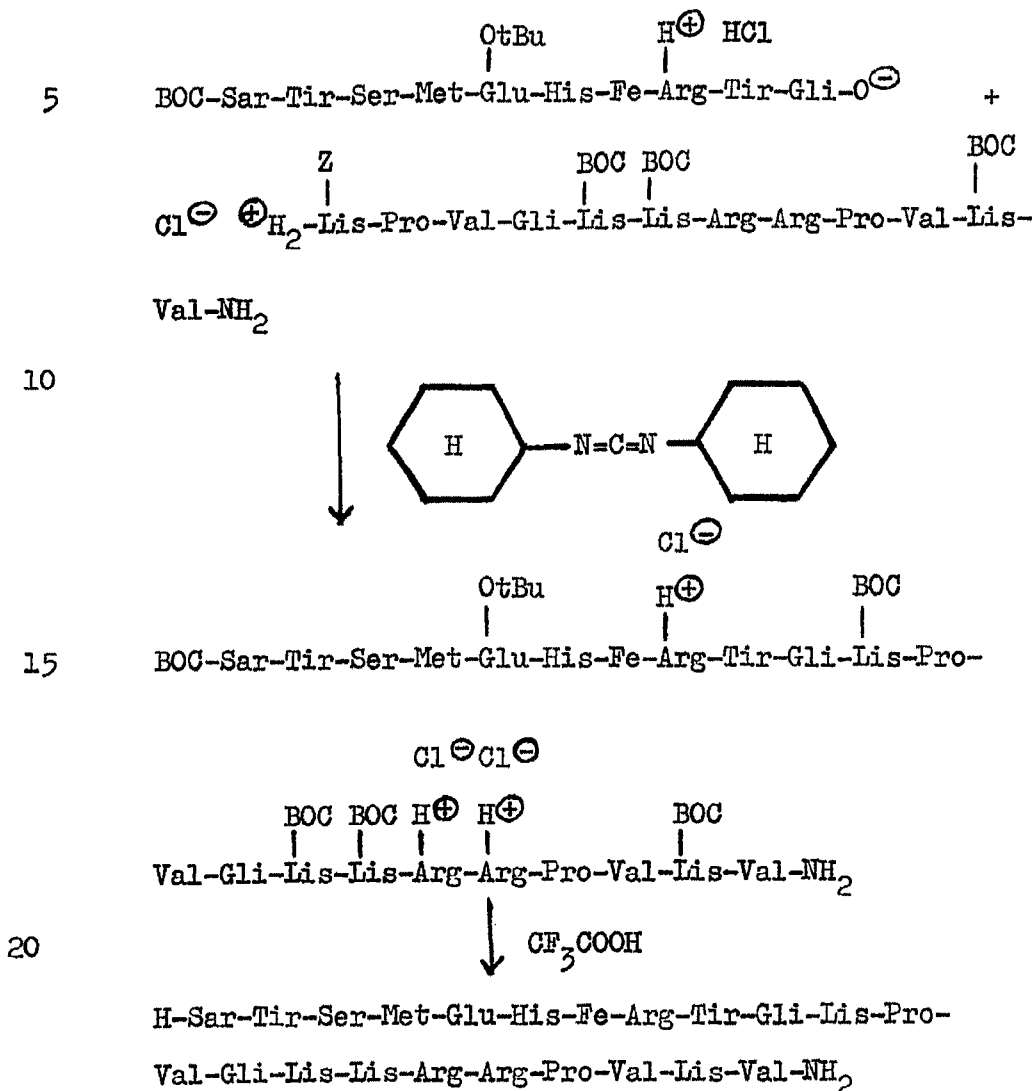
30
7.12.70.

Según este procedimiento, se obtiene uno de



los polipéptidos de la presente Invención, como se muestra en la Tabla 5.

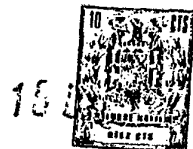
Tabla 5



25 La "sal de adición de ácido correspondiente" antes mencionada, se pone de ejemplo mediante una sal de adición de ácido inorgánico (por ejemplo clorhidrato, sulfato o semejante) y una sal de adición de ácido orgánico (por ejemplo, acetato, formiato o semejante).

30 La reacción de condensación se lleva a cabo, generalmente, en presencia de un disolvente adecuado. Es-
7.12.70.

385407



te disolvente puede, ser, por ejemplo, dimetilformamida o dimetilsulfóxido, que pueden ser tanto anhidros como hidratados, o una de sus mezclas con, por ejemplo, cloroformo, dioxano, diclorometano o tetrahidrofurano.

5 La temperatura de reacción se encuentra, por lo general, en el intervalo entre -20°C , aproximadamente, y 30°C , aproximadamente, aun cuando la reacción puede llevarse a cabo bajo calentamiento o enfriamiento.

10 Las dos sustancias que han de formar un enlace amídico entre ellas, se emplean, por lo general, en cantidades estequiométricas, pero las proporciones pueden variarse, como se desee. Generalmente, cuando el fragmento peptídico en el lado del N terminal, es relativamente pequeño, se obtienen mejores rendimientos y resultados
15 cuando se emplea un exceso de este fragmento.

Una vez completa la reacción, el producto final puede recuperarse mediante procedimientos que son convencionales, per se.

20 Según las condiciones de reacción, este nuevo compuesto se obtiene en forma de base o en forma de sal.

Partiendo de dicha sal, puede obtenerse la base de la manera habitual, y esta base puede hacerse reaccionar con un ácido terapéuticamente aceptable para obtener la sal correspondiente. El ácido recién mencionado
25 puede ser un ácido inorgánico tal como, por ejemplo, un haluro de hidrógeno (por ejemplo ácido clorhídrico o ácido bromhídrico), ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociánico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; o un ácido orgánico tal como, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético,
30 ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico,

7.12.70.



ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succí
nico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido antranílico,
ácido cinámico, ácido naftalensulfónico o ácido sulfanili
co.

5 El producto final así obtenido puede conver-
tirse en compuestos de complejo metálico por procedimien-
tos que son convencionales, per se. Por ejemplo, se hace
reaccionar una solución acuosa del polipéptido preparado
como anteriormente, con una sal de, o el hidróxido o el
10 óxido de, uno o más de los metales cobre, níquel, cobalto,
y hierro, y la mezcla resultante se ajusta a un pH de 6 a
8, aproximadamente, con lo que se forma un compuesto de
complejo de metal pesado, entre el compuesto de metal, so
porte y el polipéptido anterior. Entre los diversos com-
15 puestos de complejo metálico así obtenibles, el compuesto
complejo de zinc se muestra sobresaliente en actividad
prolongada.

El polipéptido obtenido mediante el método de
esta Invención, puede ser administrado en diversas formas
20 farmacéuticas que contienen mezclas del mismo con exci-
pientes orgánicos o inorgánicos adecuados, farmacéutica-
mente aceptables. Los excipientes adecuados son las sus-
tancias que no reaccionan con el polipéptido anterior,
tales como gelatina, lactosa, glucosa, cloruro sódico, al
25 midón, estearato magnésico, talco, aceite vegetal, alco-
hol bencílico, goma, polialcohilenglicol, vaselina blanca,
colesterol, etc, así como otros excipientes de medicamen-
tos, convencionales.

Las formas farmacéuticas antes mencionadas
30 incluyen, entre otras, tabletas, tabletas recubiertas de
7.12.70.

385407



azúcar, pomada, polvo, crema, supositorios, solución, sus-
pensión y emulsión. Estas preparaciones nuevas pueden es-
terilizarse y/o contener auxiliares tales como preservado-
res, estabilizantes, agentes humectantes, y emulgentes.

5 Las nuevas preparaciones pueden contener, además, otras
sustancias terapéuticamente eficaces.

El compuesto que constituye el objeto de esta
Invención, puede emplearse o bien oral o parenteralmente,
pero aparece que se obtienen mejores resultados terapéuti-
cos, si se administra como sustituto de la Hormona adre-
nocorticotrópica (ACTH) por vías parenterales, tales como
inyecciones intramusculares, intravenosas e hipodérmicas.
10 La dosis es variable, pero en el caso del polipéptido, se
administra habitualmente alrededor de 0,01 miligramos
15 hasta 1 miligramo, aproximadamente, una a algunas veces
al día. En el caso del compuesto complejo de zinc, se ad-
ministra, aproximadamente, de 0,1 miligramos a 1 miligra-
mo, aproximadamente, del compuesto, una o dos veces al
día.

20 Para explicar adicionalmente la presente In-
vención, se proporcionan los ejemplos siguientes, en los
que las palabras "miligramo(s)", "gramo(s)" y "milili-
tro(s)" se abrevian, sencillamente, como "mg", "g" y "ml",
respectivamente.

25 Ejemplo 1

(1) Z-Sar-Tir-OCH₃

Se suspenden 28 g de clorhidrato de Tir-OCH₃
en 400 ml de acetonitrilo, y, enfriando con hielo, se
añaden 16,8 ml de trietilamina. Después de 30 minutos,
30 se añaden además, 22,4 g de Z-SarOH y 24,8 g de diciclo-

7.12.70.



hexilcarbodiimida. El sistema se agita, enfriando con hielo, durante 2 horas. Se deja en reposo la mezcla de reacción en un refrigerador durante la noche y, a la mañana siguiente se añaden 1 - 2 gotas de ácido acético.

5 Se separa por filtración la dicitclohexilurea formada y se elimina el acetonitrilo, del filtrado, mediante destilación. Se añade acetato de etilo (500 ml) al residuo, y se separan por filtración las sustancias insolubles. El filtrado se lava con ácido clorhídrico 1N
 10 y, después, con solución acuosa al 5% de bicarbonato sódico, seguido de desecación sobre sulfato sódico anhidro. Se elimina el acetato de etilo por destilación bajo presión reducida y el residuo cristalino se recristaliza en etanol-éter. Rendimiento 28 g (70%); p.f. 155°-157°C;
 15 $[\alpha]_D^{25,5} = + 4,8$ (c=1,0, en dimetilformamida);

Análisis elemental:

Calculado para $C_{21}H_{24}O_6N_2$: C, 62,99; H, 6,04; N, 7,00%

Encontrado: C, 63,14; H, 6,12; N, 6,85%

(2) Z-Sar-Tir-NHNH₂

20 En una mezcla de 100 ml de metanol y 20 ml de dimetilformamida, se disuelven 20 g de Z-Sar-Tir-OCH₃ seguido de la adición de 12,5 ml de hidrato de hidrazina. Se deja en reposo el sistema durante 50 horas, y los cristales resultantes se recogen por filtración, y se suspenden en 200 ml de metanol. Se hierve la suspensión y, después de enfriamiento, los cristales se recogen por filtración. Rendimiento 18,8 g (94%); p.f. 221°C (desc.);

25

$[\alpha]_D^{22,2} = + 7,4$ (c=1,0, en dimetilformamida);

Análisis elemental:

30

Calculado para $C_{20}H_{24}O_5N_4$: C, 59,99; H, 6,04; N, 13,99%;

Encontrado: C, 59,86; H, 6,08; N, 13,96%.

7.12.70.

385407

(3) Z-Sar-Tir-Ser.OCH₃

8,0 g de Z-sar-tyr-NHNH₂ son disueltos en una mezcla de 80 ml de dimetilformamida y 40 ml de H Cl 2N seguido por enfriamiento a - 10°C. A esto se añaden 5 ml de nitrito de sodio 5N bajo agitación durante 5 minutos seguido por adición de 200 ml de agua helada. El aceite precipitado es extraído con acetato de etilo y la fase orgánica es lavada con 5% de bicarbonato de sodio y agua. A la mezcla de 3,12 g de H-Ser-OCH 3H Cl y 2,8 ml de trietilamina en 50 ml de acetato de alilo se añade la anterior solución de azida. La mezcla es agitada a 3°C durante 24 horas seguido por concentración hasta residuo seco, que es solidificado por adición de éter y es lavado con acetato de etilo para obtener el compuesto deseado que funde a 159°C.

(4) Z-Sar-Tir-Ser-NH.NH₂

Se disuelven 4,68 g de Z-Sar-Tir-Ser-OCH₃ en una mezcla de 15 ml de dimetilformamida y 100 ml de metanol, seguido por la adición de 2,5 ml de hidrato de hidrazina. Se deja en reposo el sistema, a temperatura ambiente, durante 70 horas, y el precipitado semejante a un gel que resulta, se recoge por filtración. Se deja que el precipitado vuelva a gelificar en una mezcla de dimetilformamida y metanol. Se recoge el gel por filtración y se seca. Rendimiento: 4,1 g (87,5%); p.f. 215°C (descompone) (185°C sinter.) $[\alpha]_D^{22,8} = + 4,42$ (c=1,0, dimetilformamida); Análisis elemental: Calculado para C₂₃H₃₀O₇N₅: C, 56,54; H, 6,19; N, 14,33%; Encontrado: C, 55,14; H, 6,03; N, 14,44%.

7.12.70.

385407



(5)

15 L

$\begin{array}{ccccccc} & \text{OtBu} & & \text{NO}_2 & & & \text{Z} \\ & | & & | & & & | \\ \text{Z-Sar-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-} \end{array}$

5 $\begin{array}{ccccccccccc} & \text{Z} & & \text{Z} & & \text{NO}_2 & \text{NO}_2 & & & & \text{Z} \\ & | & & | & & | & | & & & & | \\ \text{Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-OH} \end{array}$

Se añade ácido trifluoroacético que contiene 1% de ácido tioglicólico (7,5 ml) a 998 ml de

10 $\begin{array}{ccc} & \text{OtBu} & & \text{NO}_2 \\ & | & & | \\ \text{BOC-Met-Glu-His-Fe-Arg-} \end{array}$

$\begin{array}{ccccccccccc} & \text{Z} & & & & \text{Z} & \text{Z} & & \text{NO}_2 & \text{NO}_2 & & \text{Z} \\ & | & & & & | & | & & | & | & & | \\ \text{-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val} \end{array}$

15 Tir-Pro-OH (Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Holandesa Nº 18811/1968, para un método de preparación de este péptido)

20 El péptido se disuelve sacudiendo la mezcla a temperatura ambiente durante 20 minutos, al cabo de cuyo tiempo se elimina por destilación a presión reducida aproximadamente la mitad del ácido trifluoroacético. Se añade éter anhidro (50 ml) y el precipitado incoloro así formado se recoge por filtración, se lava con éter y se seca. El polvo resultante se disuelve en 9 ml de dimetilformamida y, enfriando con hielo, la solución se neutraliza mediante la adición de 1,28 ml de solución al 10% de trietilamina en dimetilformamida.

25

30 Por otra parte, 211 mg de Z-Sar-Tir-Ser-NHNH₂ se disuelven en 9 ml de dimetilformamida, y se añaden a la solución 0,3 ml de HCl 6 N; El sistema se enfría a -10°C y, agitando vigorosamente, se añaden gota a gota 0,15 ml de solución acuosa 4N de nitrito sódico. Después

7.12.70.

385407



de 20 minutos, se neutraliza el sistema con 2,55 ml de solución al 10% de trietilamina en dimetilformamida, y se seca sobre sulfato sódico anhidro. Esta solución se añade a la solución de derivado heneicosanopéptido antes preparado, a -5°C y la mezcla se agita a -5°C durante 4 horas; después a 5°C durante 20 horas. A la mezcla de reacción se añaden 150 ml de acetato de etilo que contienen 0,1% de ácido tioglicólico y el precipitado resultante se recoge por filtración. Este precipitado (polverulento) se disuelve en una mezcla de acetato de etilo: piridina: ácido acético: agua: ácido tioglicólico (60:20:6:11:0,1) y la solución se cromatografía en una columna de gel de sílice (2 x 21 cm). El cromatograma se desarrolla con el mismo disolvente mixto anterior.

Las fracciones de 90 ml a 300 ml se reúnen y el acetato de etilo se elimina por destilación, seguida de la adición de agua fría. El precipitado resultante se recoge y se lava con solución acuosa al 1% de ácido acético que contiene 0,1% de ácido tioglicólico, después con agua, seguido por desecación. Rendimiento 582 mg (56%); p.f. $190-194^{\circ}\text{C}$ (descompone) (156°C , sinter.); $[\alpha]_{\text{D}}^{26,5} = -32,4^{\circ}$ (c=1,0, dimetilformamida). Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{176}\text{H}_{237}\text{O}_{46}\text{N}_{43}\text{S}_6\text{H}_2\text{O}$: C, 55,40; H, 6,51; N, 15,64; S, 0,83;

Encontrado: C, 55,15; H, 6,34; N, 15,85; S, 0,82.

(6) H-Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-OH

En 3 ml de ácido trifluoroacético que contienen 2 ml de anisol y 0,2 ml de ácido tioglicólico, se disuelven 700 mg de

7.12.70.



te 24 horas a 0°C, el producto deseado se precipita añadiendo éter enfriado con hielo (50 ml) obteniéndose un polvo fino.

El polvo se recoge por filtración y después se purifica mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, en la forma habitual. Rendimiento 630 mg (85%); p.f. 205 a 210°C (descompone) (sinterización 170 a 180°C), $[\alpha]_D^{25} = -31^{\circ}$ (c=0,5 en dimetilformamida), $Rf^2 = 0,6$, $Rf^3 = 0,74$, $Rf^4 = 0,90$. Análisis elemental como

10 $C_{176}H_{237}O_{46}N_{43}S_4 \cdot 4H_2O$; Calculado C, 55,6; H, 6,5; N, 16,3; S, 0,87. Encontrado: C, 55,4; H, 6,5; N, 16,0; S, 0,78.

(2) H-Sar-Tir-Ser-Met-Glu-His-Pe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-NH₂

Se prepara una mezcla a partir de 500 mg del tricosapéptido protegido, obtenido en el Ejemplo 2 (1), 0,75 ml de anisol, 0,05 ml de ácido tioglicólico, 1500 mg de metionina, 750 mg de triptófano y 2 ml de CF₃COOH. La mezcla se agita a 0°C durante 60 minutos y el fluoruro de hidrógeno y el CF₃COOH restantes se eliminan a presión reducida.

15

20

El residuo se toma en 25 ml de agua y la solución se lava tres veces, empleando 20 ml de agua cada vez. La capa acuosa se hace pasar a través de una columna de 75 ml de Amberlita IRA-400 (forma acetato) y la columna se lava con una solución acuosa de ácido acético al 0,1% (en volumen). El efluente total se concentra a sequedad a presión reducida. El residuo se disuelve en 10 ml de una solución acuosa al 1% (en peso) de ácido tioglicólico y se deja la solución a 50°C durante 12 horas, en una corriente de nitrógeno. La solución resultante se di-

25

30

7.12.70.

385407



luye con 400 ml de agua y se aplica a una columna de carboximetil celulosa (2,5 x 20 cm), cuya columna se eluye sucesivamente, con 500 ml de solución tampón de acetato amónico 0,1 M (pH 6,5), 500 ml de solución tampón de acetato amónico 0,1 M (pH 6,5) y 500 ml de solución tampón de acetato amónico 0,15 M, en este orden. Después, la deseada (sarcosina¹) β (1-23NH₂)corticotropina, se eluye con 300 ml de solución tampón de acetato amónico 0,4 M (pH 6,5). El eluato se liofiliza obteniéndose 310 mg de polvo esponjoso, incoloro. $[\alpha]_D^{22} - 74,0^\circ$ (c= 0,5 en solución acuosa de ácido acético al 1%), UV \nearrow NaOH, 0,1N $m\mu$ max (E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$) 283,5 (25,0), 290(25,8); Rf⁴= 0,54; Electroforesis en papel: Piridina-AcOH-H₂O (1:10:89, en volumen) = α 1-23NH₂-ACTH.

La estructura química del polipéptido así obtenido, se confirma también mediante un analizador de amino ácidos.

Ejemplo 3

(1) Z-Albu-Tir-NH₂

A una solución hecha partiendo de 23 g de H-Tir-OCH₃, 14 ml de trietilamina y 400 ml de acetonitrilo, se añaden 19 g de Z-AlbuOH y 20 g de dicitclohexil carbodiimida a 0°C, y la solución se agita a 0°C durante 24 horas. Después de filtrar la mezcla de reacción, el filtrado se condensa a sequedad. El residuo se disuelve en 400 ml de acetato de etilo y la solución se lava con ácido clorhídrico N, con una solución acuosa al 5% de bicarbonato sódico y con agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora en vacío, obteniéndose un residuo siruposo (rendimiento 32 g). Este residuo siruposo se disuelve en

7.12.70.



200 ml de metanol, y a la solución se añaden 14 ml de hidrato de hidrazina. Después de dejar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche, se elimina el disolvente por evaporación en vacío, obteniéndose un sólido cristalino. Este sólido se recristaliza en metanol acuoso obteniéndose 27 g de la hidrazida deseada, que funde a 144-149°C (descompone). $R_f^1 = 0,61$. Análisis elemental como $C_{21}H_{26}O_5N_4$: Calculado: C, 60,85; H, 6,32; N, 13,52: Encontrado: C, 60,66; H, 6,58; N, 13,58.

10 (2) Z-Albu-Tir-SerOCH₃

Se disuelven 12,42 g de Z-Albu-Tir-NHNH₂ en una mezcla de 100 ml de dimetilformamida y 60 ml ácido clorhídrico 2N. A la mezcla se añaden 8 ml de nitrito sódico 2N a una temperatura comprendida entre -5°C y -10°C, durante 5 minutos. La mezcla de reacción se diluye después con 300 ml de solución acuosa saturada de cloruro sódico, enfriada con hielo. La azida que se obtiene se extrae dos veces con 200 ml cada vez, de acetato de etilo enfriado con hielo. El acetato de etilo se lava con solución acuosa al 5% de bicarbonato sódico y solución acuosa saturada de cloruro sódico, enfriadas con hielo, y se seca sobre sulfato sódico.

Esta solución de la azida se añade a una mezcla preparada con 80 ml de acetato de etilo, 20 ml de dimetilformamida, 4,7 g de H-Ser-OCH₃.HCl. y 4,2 ml de trietilamina, y la mezcla se agita a 0°C durante 46 horas. La mezcla de reacción se lava con una solución acuosa al 4% de bicarbonato sódico, ácido clorhídrico N y agua. Después de secar la fase orgánica sobre sulfato sódico, se

30
7.12.70.

385407



151

duo se cristaliza en acetato de etilo-éter de petróleo ob
teniéndose 9,7 g del compuesto deseado, que funde a
169,5 - 170,5°C(descompone). $Rf^1 = 0,54$, $[\alpha]_D^{28} -43,0$
(c=1,0 en metanol). Análisis elemental como $C_{25}H_{31}O_8N_3$:

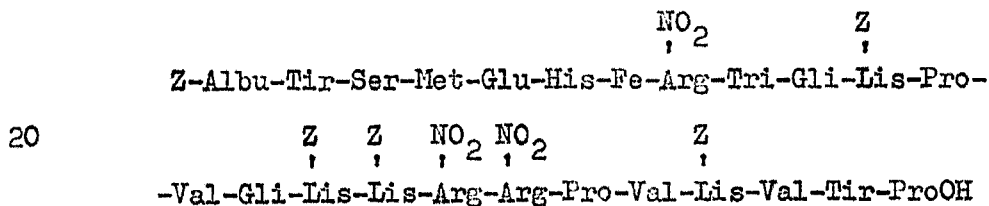
5 Calculado: C, 59,87; H, 6,23; N, 8,38. Encontrado: C,
59,83; H, 6,13; N, 8,61.

(3) Z-Albu-Tir-Ser-NHNH₂

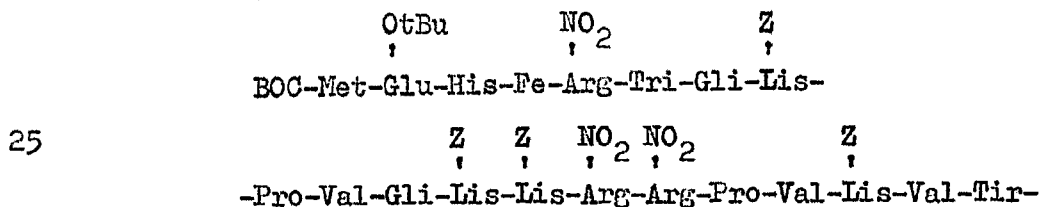
A una solución de 9 g de Z-Albu-Tir-Ser-
OCH₃ en 100 ml de metanol se añaden 10 ml de hidrato de
10 hidrazina, y la mezcla se deja a temperatura ambiente du-
rante 10 horas. Se elimina el disolvente por evaporación
en vacío, y después el residuo se cristaliza en éter.

Rendimiento 8,2 g; Punto de fusión 149,5°C a 151,0°C (des-
compone). $Rf^1 = 0,18$; $[\alpha]_D^{25} -48,0$ (c=1,0 en dimetilfor-
15 mamida). Análisis elemental como $C_{23}H_{29}O_7N_5$: Calculado:
C, 56,66; H, 6,00; N, 14,73.

(4)



(4-1) 3,4 g de



25 ProOH, se disuelven en 30 ml de ácido trifluoroacético
enfriado con hielo, que contiene 0,1 ml de ácido tioglicó
lico, y se agita durante 25 minutos a 15°C. La solución
30 se concentra en vacío hasta unos 10 ml, y se precipita

7.12.70.

385407

16



un producto mediante la adición de 100 ml de éter. El pre-
cipitado se recoge por filtración y se seca sobre hidróxi-
do de sodio, en vacío. El polvo seco se disuelve en 20 ml
de dimetilformamida y a la solución se añade 0,5 ml de
5 trietilamina y después se enfría a -20°C .

(4-2) 633 mg de Z-Albu-Tir-Ser-NH.NH₂ se
disuelven en una mezcla de 15 ml de dimetilformamida y 1
ml de ácido clorhídrico 6N, y a la solución se añaden 0,4
ml de nitrito sódico 4N a -5°C . La mezcla se agita duran-
10 te 20 minutos a -5°C , y a la mezcla se añaden 0,9 ml de
trietilamina enfriada con hielo, y después se seca sobre
sulfato sódico. La solución seca se filtra y el filtrado
se añade a la solución de la mezcla obtenida mediante el
método (4-1) anterior. La mezcla se agita durante 6 horas
15 a -10°C y durante otras 10 horas a 0°C . A la mezcla de
reacción se añade una solución de azida preparada recién-
amente partiendo de 320 mg de Z-Albu-Tir-Ser-NHNH₂ me-
diante los mismos procedimientos anteriores, y la mezcla
se agita durante otras 24 horas a 0°C . El producto se pre-
20 cipita por la adición de éter enfriado con hielo y se re-
coge por filtración. El precipitado que resulta se disuel-
ve en una mezcla de acetato de etilo:piridina:ácido acéti-
co: agua (60:20:6:11) y la solución se aplica a una colum-
na de gel de sílice, que se eluye con el mismo disolvente.
25 El compuesto sale pronto. La fracción principal se reúne
y se seca en vacío. Al residuo resultante se añade agua de
hielo obteniéndose un polvo microcristalino fino, que se
recoge por filtración y se lava con ácido acético al 1% y
después con agua. Rendimiento 3,2 g; punto de fusión
30 170°C (se descompone, 145°C sinterización), $[\alpha]_{\text{D}}^{28} -31,6$

7.12.70.

385407 15 Dic



($c = 0,5$ en dimetilformamida), $Rf^1 = 0,0$, $Rf^2 = 0,55$.

(5) H-Albu-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-
Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-ProOH

5 Se tratan 3 g de producto del método anterior (4-2) con fluoruro de hidrógeno anhidro y se purifica según los mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 1(6). Rendimiento 1,7 g., $Rf^4 = 0,55$; Electroforesis en papel: pH 1,9 (Tampón ácido acético-ácido fórmico; 500V, 60 minutos) = -9,0 cm ($=\alpha^{1-24}$ ACTH), $[\alpha]_D^{23} -81,1^{\circ}$
10 ($c=1,0$, en 1% ácido acético), Análisis de amino ácidos (hidrolizado con ácido clorhídrico 5,7 N, 110°C, 24 horas): Lis 3,9 (4), His 1,0(1), Arg 2,9(3), Ser 1,0(1), Glu 1,0(1) Pro 2,9 (3) Gli 2,0(2), Albu 0,9 (1), Val 2,8 (3), Met 0,9(1), Tir 1,9(2), Fe 1,0(1). El compuesto se
15 convierte en la correspondiente sal por adición del ácido clorhídrico o en la correspondiente sal por adición del ácido acético, por métodos conocidos per se.

Ejemplo 4

(1) BOC-Sar-Tir-Ser-Met-NHNH₂

20 A una solución preparada partiendo de 4,13 g de H-Tir-Ser-MetOCH₃, 100 ml de acetonitrilo y 10 ml de dimetilformamida, se añaden 2,3 g de BOC-Sar-OH y 2,3 g de dicitclohexilcarbodiimida, con agitación, a 0°C. La mezcla se agita durante 24 horas a 0°C y otras 10 horas a
25 20°C. La dicitclohexil urea formada se separa por filtración y el filtrado se concentra a sequedad en vacío. El residuo se disuelve en acetato de etilo caliente y la solución se lava con una solución acuosa de bicarbonato sódico al 4%, y con agua. La solución lavada se concentra a
30 pequeño volumen y después se añade éter a la mezcla res-

7.12.70.



tante. El producto que precipita se recoge por filtración y se recristaliza en metanol-éter obteniéndose 4,8 g ($Rf^1 = 0,3$).

5 El producto se disuelve en metanol-dimetilformamida caliente y a esta solución se añaden 2 ml de hidrato de hidrazina. La mezcla se recoge después por filtración y se lava con agua y con etanol, obteniéndose 4,3 g de la hidrazina. $Rf^1 = 0,0$, $Rf^2 = 0,55$.

(2) $\begin{array}{c} \text{OtBu} \\ | \\ \text{BOC-Sar-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Tri-GliOH} \end{array}$

10

A una solución preparada partiendo de 900 mg de BOC-Sar-Tir-Ser-Met-NHNH₂, 10 ml de dimetilformamida y 4 ml de ácido clorhídrico N, se añaden 1,7 ml de nitrato sódico N a 0°C y la mezcla se agita durante 5 minutos. Se añaden a la mezcla de reacción acetato de etilo enfriado con hielo y solución acuosa saturada de cloruro sódico, enfriada con hielo (50 ml). La capa acuosa se extrae dos veces con acetato de etilo enfriado con hielo, Las fases orgánicas en total, se juntan, se lavan con una solución acuosa de bicarbonato sódico al 4%, y se seca sobre sulfato sódico. La solución seca se añade a una solución preparada partiendo de 1 g de la sal del ácido acético de

15

20

$\begin{array}{c} \text{OtBu} \\ | \\ \text{H-Glu-His-Fe-Arg-} \end{array}$

25

-Tri-GliOH, 0,4 ml de trietilamina y 30 ml de dimetilformamida, y se evapora en vacío el acetato de etilo, a 10°C. La solución resultante se agita a 30°C durante 12 horas. Se añade una solución adicional de azida (que se prepara partiendo de 500 mg de BOC-Sar-Tir-Ser-Met-NHNH₂, como se

30

7.12.70.

385407



ha descrito anteriormente) y la mezcla reaccionante se di
 luye con 500 ml de acetato de etilo enfriado con hielo,
 obteniéndose precipitados amorfos. Los precipitados se re
 cogen por filtración y se recristalizan en dimetilformami
 5 da-metanol obteniéndose el producto purificado. Rendimien
 to 1,4 g, $[\alpha]_D^{21}$ - 19,0° (c=1 en dimetilformamida),
 $Rf^3 = 0,30$, $Rf^4 = 0,75$.

(3) H-Sar-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-
 Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-NH₂

10

A una solución preparada partiendo de

OtBu
 |

0,74 g de BOC-Sar-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Tri-GliOH y
 dimetilformamida, se añaden 0,5 ml de ácido clorhídrico
 N, enfriado con hielo, a 0°C. Se precipita el clorhidrato
 15 mediante la adición de 500 ml de acetato de etilo, enfria
 do con hielo. Los precipitados se recogen por centrifuga
 ción, se lavan con acetato de etilo y se secan en vacío.
 El polvo, resultante se disuelve en una mezcla de 50 ml
 de dimetilformamida y 20 ml de piridina, y después se añ
 20 de a la mezcla 1,1 g de la sal tosilato de

BOC BOC BOC
 | | |
 H-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-

Val-NH₂, seguido de la adición de 400 mg de dicitclohexil-
 carboxilimida. La mezcla se agita durante 4 días a 10°C.

25

Después de concentrar la solución en vacío a 20 ml, se
 añaden 500 ml de acetato de etilo, obteniéndose un preci
 pitado amorfo que se recoge por centrifugación y se lava
 con acetato de etilo y éter. El material se disuelve en
 una solución acuosa al 50% (volumen/volumen) de tetrahi
 30 drofurano y la solución se hace pasar a través de una co-

7.12.70.



lumna de Amberlita IRA-400 (3 x 30 cm), que se eluye con el mismo disolvente. El disolvente se elimina por evaporación, y la solución acuosa se liofiliza después obteniéndose un polvo esponjoso (rendimiento 1,92 g);

5 100 mg del eicosapéptido así obtenido, en el que los grupos amino y carboxilo, libres, están protegidos, se disuelven en 2 ml de ácido trifluoroacético del 90% y la solución se deja a temperatura ambiente durante 1 hora. El ácido trifluoroacético se elimina por evaporación, el residuo se disuelve en agua y la solución se hace pasar a través de una columna (0,5 x 20 cm) de Amberlita IRA-400 (forma ácido acético). El eluato se disuelve en 10 ml de agua y se aplica a una columna de carboximetilcelulosa (1 x 20 cm), que se eluye con un tampón de acetato amónico, por medio del método de elución de gradiente, desde 0,1 M hasta 1 M, a pH 6,8. El eicosapéptido puro se eluye al tampón 0,3 M, aproximadamente. El eluato se concentra en vacío a pequeño volumen y después se liofiliza hasta peso constante. Rendimiento 70 mg. $[\alpha]_D^{22} = -61^{\circ}$ (c=0,5 en ácido acético al 1%); $Rf^3 = 0,0$, $Rf^4 = 0,5$.

10

15

20

Ejemplo 5

(1) BOC-Albu-Tir-NHNH₂

A una solución de H-Tir-OCH₃.HCl (23 g) y trietilamina(14 ml) en 400 ml de acetonitrilo, se añade BOC-Albu.OH (20 g) y dicitclohexil carbodiimida (22 g), a 0°C, y la solución se agita a 0°C durante 24 horas. Después de filtrar la mezcla de reacción, se evapora el filtrado a sequedad. El residuo se disuelve en acetato de etilo (400 ml) y después la solución de acetato de etilo

25

30

7.12.70.

385407



5 se lava con ácido clorhídrico N, con una solución al 5%
de bicarbonato sódico y con agua, se seca sobre sulfato
sódico y se evapora en vacío, obteniéndose un residuo si-
ruposo (rendimiento 31 g). Este residuo se disuelve en me-
tanol (200 ml) y a esta solución se añade hidrato de hi-
drazina (14 ml). Después de dejar la mezcla a temperatura
ambiente durante 12 horas, se elimina el disolvente por
evaporación en vacío, obteniéndose un sólido cristalino.
Este sólido se recristaliza en metanol acuoso obteniéndose
10 se 28 g de la hidrazida. $Rf^1 = 0,64$.

Análisis para $C_{18}H_{28}O_5N_4$: Calculado: C, 56,82; H, 7,42;
N, 14,73.

Encontrado: C, 56,73; H, 7,51; N, 14,76

(2) BOC-Albu-Tir-Ser-OCH₃

15 Se disuelve BOC-Albu-Tir-NHNH₂ (16 g) en
una mezcla de dimetil formamida: HCl 2N (100 ml : 60 ml)
y a esto se añade nitrito sódico 2 N (6 ml) de -5º a
-10ºC, durante 7 minutos.

20 La mezcla de reacción se diluye después con
agua saturada con NaCl, enfriada con hielo (300 ml). La
azida que se separa se extrae con acetato de etilo enfria-
do con hielo (200 ml x 2). La solución de acetato de eti-
lo se lava con solución acuosa de bicarbonato sódico al
5%, enfriada con hielo, y agua saturada de NaCl, enfriada
25 con hielo, y se seca sobre sulfato sódico.

Esta solución de azida se añade a una so-
lución de H-Ser-OCH₃ (7,8 g) y trietilamina (7,5 ml) en
acetato de etilo (150 ml), y la mezcla se agita a 0ºC du-
rante 2 días.

30
7.12.70.

La mezcla de reacción se lava con una solu



ción acuosa al 4% de bicarbonato sódico, ácido clorhídrico N y agua. Después de secar la fase orgánica sobre Na_2SO_4 , se elimina el disolvente en vacío.

5 El residuo se cristaliza en acetato de etilo-éter de petróleo, obteniéndose 10,8 g de BOC-Albu-Tir-Ser- OCH_3 . $R_f^1 = 0,58$; Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{O}_8\text{N}_3$: C, 56,52; H, 7,12; N, 8,99; Encontrado: C, 56,44; H, 7,23; N, 9,13.

(2) BOC-Albu-Tir-Ser-NHNH₂

10 A una solución de BOC-Albu-Tir-Ser- OCH_3 (10 g) en metanol (100 ml) se añade hidrato de hidrazina (10 ml) y la mezcla se deja a temperatura ambiente durante 8 horas. Se elimina el disolvente por evaporación en vacío y el residuo se cristaliza después en éter-éter de petróleo. Rendimiento 9,3 g. $R_f^1 = 0,21$. Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{O}_{17}\text{N}_5$: C, 53,95; H, 7,12; N, 14,98; Encontrado: C, 53,80; H, 7,41; N, 14,83.

(3) H-Albu-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Tri-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro OH

20 (3-1) Componente de amina

OtBu
|

Se disuelven 600 mg de H-Glu-His-Fe-Arg-Tri-Gli-

BOC BOC BOC BOC
| | | |

25 -Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-OtBu, como sal por adición del ácido tetraacético, y 0,27 ml de trietilamina, en una mezcla de 2 ml de dimetilformamida y 1 ml de piridina. La solución se enfría a -5°C .

(3-2) Solución de azida

30 A una solución preparada a partir de 200
7.12.70.

385407

150



mg de BOC-Albu-Tir-Ser-Met-NH₂ y 4 ml de dimetilformamida, se añaden 0,3 ml de ácido clorhídrico 4 N, con agitación, a -10°C. La mezcla se agita durante 10 minutos a -10°C.

5

(3-3) Copulación

La solución de azida anterior, se añade a la solución en dimetilformamida del componente de amida, y la mezcla se agita durante 40 horas a 0°C. La solución se concentra en vacío a pequeño volumen, y después se diluye con 20 ml de agua, enfriada con hielo. El precipitado formado se recoge por centrifugación y se lava con agua y éter, obteniéndose un polvo amarillento amorfo (rendimiento 730 mg). El polvo se trata con ácido trifluoroacético mediante los mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 4(3). El producto resultante se purifica con una columna de carboximetilcelulosa, mediante los mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 4(3), para obtener el péptido deseado. La estructura del péptido se confirma mediante un analizador de amino-ácidos.

10

15

20

Ejemplo 6

10 mg de (Sarcosina¹) β (1-24) corticotropina, preparada en el Ejemplo 1(6), se disuelven en 5 ml de agua destilada. A la solución se añaden 74 mg de ZnCl₂ disueltos en 2 ml de agua y 30 mg de Na₂HPO₄·12H₂O disueltos en 2 ml de agua. La solución se diluye con agua hasta 20 ml y se ajusta a pH 8,0 a 8,5, mientras se agita la mezcla. El gel precipitado se recoge por centrifugación, obteniéndose complejo de zinc de (Sarcosina¹) β (1-24)corticotropina.

25

7.12.70.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en el Japón, el 11 de Noviembre de 1969, bajo el Nº 90321/1969, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

10

REIVINDICACIONES

15

Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20

1ª.- Un procedimiento para la fabricación de un polipéptido seleccionado del grupo constituido por un compuesto polipeptídico indicado mediante la fórmula general: X-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-

25

25-5-73

385407

-L-arginil-L-arginil-P (en la que X representa sarcosilo o α -amino-isobutirilo, P es un miembro seleccionado del grupo constituido por L-prolil-L-valina, L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosina y L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-proling), su amida sin su-
5 tituir, su sal por adición de ácido, fisiológicamente tolerable, o su complejo de metal pesado, que comprende: (a) hacer reaccionar un derivado protegido de un tripéptido, de fórmula : X-L-tirosil-L-serina (en la
10 que X represente sarcosilo o α -amino-isobutirilo, el grupo carboxilo del C terminal de la L-serina, está activado, y el grupo α -amino del N-terminal de la sarcosina o ácido α -amino-isobutírico, está protegido por un sustituyente protector), con un miembro seleccionado
15 del grupo constituido por un derivado protegido de un polipéptido indicado mediante la fórmula: L-metionil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-P' (en la que P' es un miembro
20 seleccionado del grupo constituido por, L-prolil-L-valina, L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosina y L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina, los ϵ -amino grupos de la L-lisina estén protegido por sustituyentes protectores, y cada uno de los grupos,
25 γ -carboxilo del ácido L-glutámico, grupo carboxilo del

385407

C terminal y el grupo guanidino de la L-arginina pueden estar protegidos por un sustituyente protector), su amida sin sustituir y su sal por adición de ácido, (b) hacer reaccionar un derivado protegido de un tetrapéptido de fórmula general: X-L-tirosil-L-seril-L-metionina (en la que X representa sarcosilo o α -amino-isobutirilo, el grupo carboxilo del C terminal de la L-metionina está activado, y el grupo α -amino del N terminal de la sarcosina o ácido α -amino-isobutírico está protegido por un sustituyente protector) con un miembro seleccionado del grupo constituido por un derivado protegido de un polipéptido indicado mediante la fórmula: L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofenil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-P' (en la que P' es un miembro seleccionado del grupo constituido por L-prolil-L-valina, L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosina y L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina, los grupos ϵ -amino de la L-lisina están protegidos por sustituyentes protectores y cada uno de los grupos, γ -carboxilo del ácido L-glutámico, grupo carboxilo del C terminal y grupo guanidino de la L-arginina, puede estar protegido por un sustituyente protector), su amida sin sustituir y su sal por adición de ácido, o (c) hacer reaccionar un derivado protegido de un decapeptido de fórmula

25-5-73

- 35 -

POOR
QUALITY

385407

5 fórmula general: X-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-gluta-
mil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-
-glicina (en la que X representa sarcosilo o α -amino-
-isobutirilo, el carboxilo del C-terminal de la glici-
na está activado, el grupo α -amino del N-terminal de
la sarcosina o ácido α -amino-isobutírico está prote-
gido por un sustituyente protector, y el grupo γ -carbo-
xilo del ácido L-glutámico puede estar protegido por
un sustituyente protector), con un miembro selecciona-
do del grupo constituido por un derivado protegido de
10 un polipéptido indicado mediante la fórmula: L-lisil-L-
-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-argi-
nil-P' (en la que P' es un miembro seleccionado del gru-
po constituido por L-prolil-L-valina L-prolil-L-valil-
15 -L-lisil-L-valil-L-tirosina y L-prolil-L-valil-L-lisil-
L-valil-L-tirosil-L-prolina, los grupos ξ -amino de la
L-lisina están protegidos por sustituyentes protectores,
y cada uno de los grupos, carboxilo del C terminal y
grupo guanidino de la L-argina, puede estar protegido
20 por un sustituyente protector), su amida sin sustituir
y una sal por adición de ácido correspondiente; y libe-
rar los grupos amino y carboxilo protegidos del polipép-
tido así formado; y, cuando se requiera, convertir el
polipéptido libre resultante en una sal por adición de
25 ácido fisiológicamente tolerable o en un complejo de me

385407

tal pesado.

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la reacción se lleva a cabo en el modo explicado en el apartado (a).

5 3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la reacción se lleva a cabo en el modo explicado en el apartado (b).

10 4ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, en el que la reacción se lleva a cabo en el modo explicado en el apartado (c).

5ª.- Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, donde X es sarcosilo.

15 6ª.- Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, donde X es α -amino-isobutirilo.

7ª.- Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, donde P es L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosina.

20 8ª.- Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, donde P es L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina.

25 9ª.- Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 8ª, donde la sal por adición de ácido tolerable, es sal del ácido

385407

acético o sal del ácido clorhídrico.

5
10
10^a.— Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 9^a, donde el sustituyente protector del grupo α -amino del N terminal de la sarcosina o ácido α -amino-isobutírico se protege mediante un grupo benciloxicarbonilo o un grupo butoxicarbonilo terciario, el grupo γ -carboxilo del ácido L-glutámico se protege mediante un grupo butilo terciario, los grupos guanidino de la L-arginina se protegen mediante grupos nitro y los grupos ξ -amino de la L-lisina se protegen mediante grupos benciloxicarbonilo o grupos butoxicarbonilo terciarios.

15
11^a.— Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 4^a, donde el grupo carboxilo del C terminal se activa mediante la formación de un éster activo, mediante la formación de una azida o mediante el empleo de un agente de condensación.

20
12^a.— Un procedimiento, como se reivindica en la reivindicación 3^a, donde el grupo carboxilo del C terminal se activa mediante la formación de un anhídrido de ácido o mediante la formación de un anhídrido mixto.

25
13^a.— Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1^a y 4^a, donde los

grupos amino y carboxilo protegidos, se liberan mediante el empleo de fluoruro de hidrógeno.

14ª.- Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 3ª y 4ª, donde los grupos amino y carboxilo protegidos, se liberan mediante el empleo de ácido trifluoroacético.

15ª.- Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, 7ª y 9ª a 13ª, donde el polipéptido es un miembro escogido del grupo constituido por un compuesto polipeptídico indicado por la fórmula: Sarcosil-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosina amida, su sal del ácido acético, su sal del ácido clorhídrico y su complejo de zinc.

16ª.- un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª y 8ª a 13ª, donde el polipéptido es un miembro escogido del grupo constituido por un compuesto polipeptídico indicado por la fórmula: Sarcosil-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina, su sal del ácido acético, su sal

385407

del ácido clorhídrico y su complejo de zinc.

5 17a.- Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1a a 4a, 6a, 7a y 8a a 13a, donde el polipéptido es un miembro escogido del grupo constituido por un compuesto polipeptídico indicado por la fórmula: α -amino-isobutiril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosina, su amí a sin
10 sustituir, su sal del ácido acético, su sal del ácido clorhídrico y su complejo de zinc.

15 18a.- Un procedimiento, como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1a a 4a, 6a y 8a a 13a, donde el polipéptido es un miembro escogido del grupo constituido por un compuesto polipeptídico indicado por la fórmula: α -amino-isobutiril-L-tirosil-L-seril-L-metionil-L-glutamil-L-histidil-L-fenilalanil-L-arginil-L-triptofanil-glicil-L-lisil-L-prolil-L-valil-glicil-L-lisil-L-lisil-L-arginil-L-arginil-L-prolil-L-valil-L-lisil-L-valil-L-tirosil-L-prolina, su sal del
20 ácido acético, su sal del ácido clorhídrico y su complejo de zinc.

25 19a.- Un procedimiento para la fabricación de un polipéptido.

385407

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y con los fines que se han especificado.

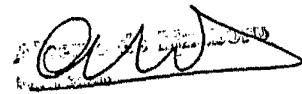
Esta Memoria consta de cuarenta y una hojas escritas a máquina por una sola cara.

- 1 JUN. 1973

5

Madrid,

P.A.



25-5-73
GDS/JAR.

- 41 -



**POOR
QUALITY**