

401763



Int. Cl.: C07C

Nº. 401.763

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de un...^a

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: ELI LILLY AND COMPANY

RESIDENCIA: 307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS,
Indiana, USA.

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE
UN COMPUESTO DE AMINOACIDO N-PROTEGIDO"

Fecha: Patente estadounidense nº 134.30 del 15.4.71

40



1
5
10
15
20
25
30

fenilo protegido;

R₈ es hidroxilo, metoxi, etoxi, terc-butoxi, 2,2,2-tricloroetoxi, N-oxisuccinimida, fenoxi, benciloxi, 4-nitrobenciloxi, 2,4,5-triclorofenoxi, pentaclorofenoxi o pentafluorfenoxi,

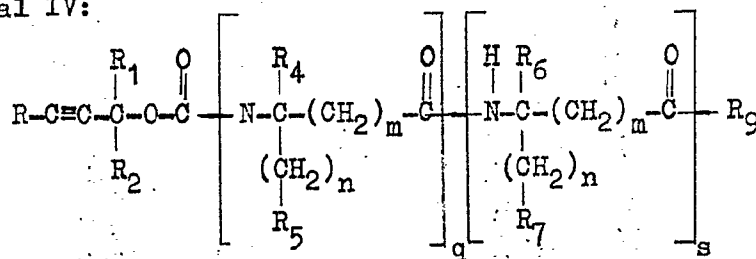
y las sales del mismo de adición con ácido, de metales alcalinos, de metales alcalino-térreos, de aminas, dietilamina, trietilamina, dibencilamina, dicitclohexilamina y 1,4-diaza-dicitclo[2,2,2] octano,

m y n son independientemente 0 o un número entero de 1 a 4;

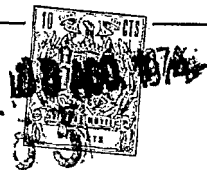
p es 0 o un número entero de 1 a 14;

con la condición de que cuando p es 1 o mayor, entonces los significados de R₆, R₇ m y n entre los restos de aminoácido individuales que constituyen la cadena pueden ser iguales o diferentes.

Estos compuestos se preparan haciendo reaccionar un compuesto alquilcarbiniloxycarbonílico de fórmula general IV:

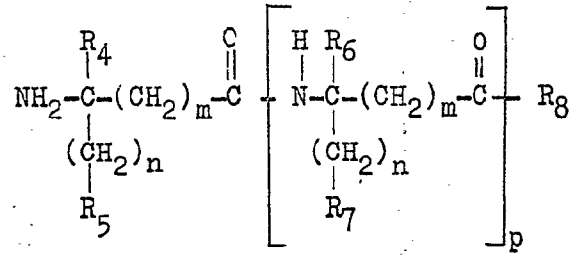


donde R₉ es flúor, cloro, fenoxi, p-nitrofenoxi, 2,4,5-triclorofenoxi, pentaclorofenoxi, pentafluorfenoxi, N-oxisuccinimida, una sal de adición con ácido o una sal amínica, q y s son independientemente 0 a 13, siendo la suma de q y s no superior a 13 y R, R₁, R₂, R₄, R₅, R₆ y R₇ son los definidos anteriormente, con un compuesto aminoácido de fórmula V:



4

1



5

donde R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, n, m y p son los definidos anteriormente y, opcionalmente, cuando R₈ es hidroxilo, formando la sal de amina deseada o el éster R₈ antes definido.

10

También esta invención proporciona un procedimiento para la preparación de péptidos utilizando los compuestos N-protégidos de fórmula III.

15

De acuerdo con esta invención, se hace reaccionar un éster clorofórmico o fluofofórmico de un carbinol acetilénico, preferiblemente un carbinol acetilénico terciario, tal como cloroformiato de 3-metil-1-butin-3-ilo, con un aminoácido para dar un aminoácido protegido con alquilnilcarbiniloxycarbonilo.

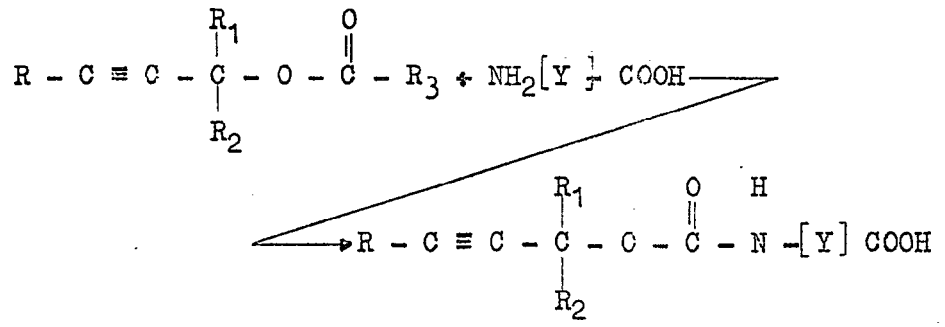
20

Análogamente, se hacen reaccionar los ésteres fenilcarbónicos y halofenilcarbónicos de los carbinoles acetilénicos con el grupo amino de los aminoácidos para formar el aminoácido protegido con alquilnilcarbiniloxycarbonilo.

25

Los ésteres halofórmicos y los ésteres fenilcarbónicos de los carbinoles acetilénicos son ésteres activos que reaccionan rápidamente con el grupo amino de los aminoácidos para formar el aminoácido N-bloqueado o N-protégido como ilustra el siguiente esquema de reacción:

30



401763

19 AGO 1974



1 donde R es hidrógeno, cloro, fenilo o fenilo sustituido, R₁
es hidrógeno o alquilo inferior, R₂ es alquilo inferior,
R₃ es flúor, cloro, fenoxi o fenoxi sustituido e Y es un
resto aminoácido.

5 Los aminoácidos protegidos en el grupo amino así
obtenidos se emplean en la síntesis de péptidos, por ejem-
plo, los fragmentos péptidos útiles en la síntesis del agen-
te hipoglicémico, glucagon, así como cualquier otro frag-
mento péptido deseado, por ejemplo pentagastrina.

10 El grupo protector del amino aquí descrito es un
grupo protector especialmente valioso, ya que es fácilmente
eliminado del producto de reacción péptido después de la
copulación del aminoácido protegido. El grupo protector es
fácilmente separado por hidrogenolisis catalítica a pH neu-
15 tro, en condiciones suaves de temperatura y presión.

Una característica especialmente interesante del gru-
po acetilénico bloqueante del amino es que puede ser sepa-
rado por hidrogenolisis catalítica en presencia de grupos
que contienen azufre. Por ejemplo, la metionina N-protegida
20 puede hacerse reaccionar con otro aminoácido o con un amino-
péptido para formar el péptido deseado conteniendo el bloque ace-
tilénico N-terminal, que después puede ser separado por hi-
drogenolisis catalítica. Análogamente, los derivados de
cisteína N-bloqueados y S-bloqueados pueden ser empleados en
la síntesis de péptidos y el grupo bloqueante acetilénico
25 N-terminal puede ser separado a continuación por hidrogeno-
lisis catalítica.

Por consiguiente, esta invención también proporciona
un método mejorado para la síntesis de péptidos, en el que
30 el grupo alquinilcarbiniloxycarbonilo es empleado como gru-

401763



1 El término "aminoalquilo inferior" se refiere a
2-aminoetilo, 3-aminopropilo, 2-aminopropilo, 2-aminobutilo,
y grupos alquilo inferior C₁-C₄ similares sustituidos con
un radical amino y el término "aminoalquilo inferior pro-
5 tegido" se refiere a los grupos aminoalquilo inferior ci-
tados en los que la función amino está protegida por sus-
titución con grupos tales como terc-butiloxicarbonilo,
5-amiloxicarbonilo y adamantiloxicarbonilo.

10 El término "mercaptoalquilo inferior" se refiere a
alquil(C₁-C₄)mercapto, por ejemplo mercaptometilo, 2-mer-
captoetilo, 3-mercaptopropilo y similares.

15 El término "alquil(inferior)mercaptoalquilo infe-
rior" se refiere a un grupo alquilo inferior sustituido con
alquil(C₁-C₄)mercapto, por ejemplo metilmercaptoetilo, iso-
propilmercaptometilo, n-propilmercaptoetilo, metilmercapto-
butilo, 2-metilmercapto-2-propilo, 3-metilmercapto-2-butilo,
2-metilmercaptometil-2-propilo y similares.

20 El término "mercaptoalquilo inferior protegido", se
refiere a los grupos mercaptoalquilo inferior en los que el
grupo mercapto está protegido o bloqueado por grupos tales
como tetrahidropirranilo, p-metoxibencilo, isobutiloximetilo,
β,β-dietoxicarboniletilo, benciloxicarbonilo, terc-butilo,
alquil(inferior)carbamoilo como etilcarbamoilo y acetamido-
metilo.

25 El término "carboxialquilo inferior" puede compren-
der los grupos carboximetilo, carboxietilo, 2-carboxi-2-
propilo, 2-carboximetil-2-propilo y similares.

30 El término "carboxialquilo inferior protegido" se
refiere a los ésteres bencílicos y terc-butílicos de los
grupos carboxialquilo inferior C₁-C₄ antes definidos.



1 El término "guanidinoalquilo inferior" se refiere a guanidinometilo, guanidinoetilo, 2-guanidino-2-propilo, α,α -dimetilguanidinoetilo y similares.

5 El término "guanidinoalquilo inferior protegido" se refiere a grupos alquilo inferior C_1-C_4 sustituidos con guanidino, donde la función guanidino, por ejemplo como en la arginina de aminoácido, está protegida por grupos tales como carbobenzoxi, terc-butiloxicarbonilo, terc-amiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo y nitro.

10 El término "guanidinooxialquilo inferior" se refiere a los sustituyentes guanidinoalquilo inferior C_1-C_4 antes citados en los que el grupo guanidino heterocíclico está unido al grupo alquilo inferior a través de un átomo de oxígeno adicional.

15 El término "imidazolimetilo protegido" se refiere al grupo N^{imidado}-amino protegido por sustitución con grupos tales como bencilo, adamantiloxicarbonilo y terc-butoxicarbonilo.

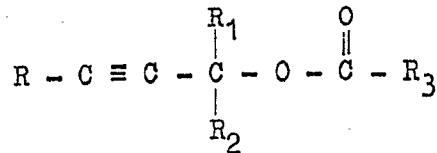
20 Los aminoácidos protegidos con un grupo alquilcarbiniloxicarbonilo de Fórmula I se preparan por reacción de un éster activo de un carbinol acetilénico con el aminoácido deseado. Los ésteres clorofórmicos y fluofórmicos o los ésteres fenilcarbónicos y fenilcarbónicos sustituidos de ciertos carbinoles acetilénicos secundarios y terciarios son ésteres acetilénicos activos especialmente útiles para
25 la preparación de los compuestos de Fórmula I. Los ésteres halofórmicos y fenilcarbónicos de carbinol acetilénico empleados en esta invención están representados por la siguiente Fórmula II.

30

4091763



1974



II

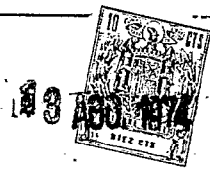
1
5
donde R, R₁ y R₂ tienen el significado definido en la Fórmula I y R₃ es flúor, cloro, fenoxi, p-nitrofenoxi, 2,4,5-triclorofenoxi, pentaclorofenoxi y pentafluorfenoxi.

10
15
20
25
Los ésteres activos de carbinol acetilénico de Fórmula II se preparan a partir de carbinoles acetilénicos terciarios y secundarios fácilmente asequibles, por métodos de síntesis conocidos. Por ejemplo, el 3-metil-1-butin-3-ol se hace reaccionar con difluorcarbonilo o con fósgeno, en presencia de un aceptor de haluro de hidrógeno como trietilamina, para formar el éster clorofórmico o fluofórmico de carbinol acetilénico de tal forma que R₃ en la Fórmula II es cloro o flúor. Los ésteres carbónicos de carbinol acetilénico representados por la Fórmula II, donde R₃ es fenoxi o fenoxi sustituido, se preparan por reacción de un carbinol acetilénico con un éster halofórmico de un fenol o de un fenol sustituido, en presencia de un aceptor de haluro de hidrógeno. Preferiblemente se emplean ésteres clorofórmicos de fenol en la síntesis de los ésteres carbónicos del carbinol acetilénico.

Los siguientes compuestos son ilustrativos de los ésteres halofórmicos y carbónicos activos representados por la Fórmula II:

30
cloroformiato de 3-metil-1-butin-3-ilo
cloroformiato de 3-metil-1-pentin-3-ilo
cloroformiato de 3-etil-1-pentin-3-ilo

40'9763



- 1 fluoformiato de 3-metil-1-butin-3-ilo
- cloroformiato de 1-fenil-3-metil-1-butin-3-ilo
- fluoformiato de 1-fenil-3-metil-1-pentin-3-ilo
- cloroformiato de 1-p-tolil-3-metil-1-butin-3-ilo
- 5 cloroformiato de 1-p-clorofenil-3-metil-1-pentin-3-ilo
- cloroformiato de 1-etinilciclohex-1-ilo
- cloroformiato de 1-etinilciclopent-1-ilo
- cloroformiato de 1-feniletinilciclohex-1-ilo
- fluoformiato de 3-metil-1-hexin-3-ilo
- 10 cloroformiato de 3-n-propil-1-hexin-3-ilo
- cloroformiato de 3-etil-1-heptin-3-ilo
- fenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo
- 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo
- 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo
- 15 pentafluorfenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo
- 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-etil-n-pentin-3-ilo
- fenilcarbonato de 1-fenil-3-metil-1-butin-3-ilo
- 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 1-fenil-3-metil-1-pentin-3-ilo
- 20 fenilcarbonato de 1-etinilciclohex-1-ilo
- 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 1-etinilciclohex-1-ilo
- 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 1-etinilciclopent-1-ilo
- fenilcarbonato de 1-etinilciclohept-1-ilo
- 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 1-feniletinilciclohex-1-ilo
- 25 pentafluorfenilcarbonato de 3-metil-1-pentin-3-ilo
- 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-etil-1-heptin-3-ilo
- cloroformiato de 1-cloro-3-metil-1-butin-3-ilo
- cloroformiato de 1-cloro-3-metil-1-pentin-3-ilo
- cloroformiato de 1-cloroetinilciclohexil-1-ilo
- 30 fluoformiato de 1-cloro-3-etil-1-pentin-3-ilo

- 11 -
401763



- 1 cloroformiato de 1-butin-3-ilo
fenilcarbonato de 1-butin-3-ilo
cloroformiato de 1-pentin-3-ilo
2,4,5-triclorofenilcarbonato de 1-butin-3-ilo
5 y ésteres similares.

Quando se emplea aquí, el término "haloformiato" se refiere al cloroformiato o al fluoformiato.

10 Como ya se ha mencionado, los compuestos de Fórmula I se preparan por reacción de un aminoácido con un haloformiato de carbinol acetilénico o un fenilcarbonato de carbinol acetilénico de Fórmula II.

15 La preparación del aminoácido protegido en el radical amino se realiza de la siguiente forma: Cuando el éster haloformico de Fórmula II, por ejemplo un éster cloroformico, se emplea en la preparación de un compuesto de Fórmula I, el éster se agrega a una solución acuosa de la sal sódica del aminoácido deseado, a una temperatura comprendida entre 0° y 15°C aproximadamente. La mezcla de reacción se agita durante unas 12 horas, durante cuyo tiempo se deja que la mezcla alcance la temperatura ambiente. La mezcla acuosa producida en la reacción se lava con éter y después se acidula a pH 1 aproximadamente con ácido clorhídrico concentrado. El producto precipita de la mezcla acuosa acidulada en forma de sólido o de aceite.

25 El producto de reacción aminoácido protegido con un grupo alquinilcarbiniloxicarbonilo, cuando se obtiene como precipitado sólido, se filtra y puede ser purificado después por cristalización en un disolvente adecuado.

30 Cuando el aminoácido N--protegido se obtiene como aceite o como precipitado semisólido puede ser aislado y

40-1763



1 purificado en forma de sal de amina cristalina de la si-
guiente manera.

5 El aceite precipitado se extrae de la mezcla de reac-
ción acuosa ácida con un disolvente adecuado, por ejemplo
acetato de etilo, y el extracto se lava con agua y se seca.
El extracto seco se evapora a sequedad y el producto de
reacción oleoso residual se recoge en éter. Por adición de
10 una amina orgánica básica a la solución etérea se obtiene
la sal amínica cristalina del aminoácido protegido con un
radical alquilcarbiniloxicarbonilo. Pueden prepararse
sales amínicas adecuadas con aminas orgánicas como trietil-
amina, dibencilamina, dicitclohexilamina, 1,4-diazadicitclo
[2.2.2]octano y similares. Una amina preferida es la dicit-
clohexilamina. Las sales amínicas de los aminoácidos N-pro-
15 tegidos pueden ser purificadas de nuevo por recristalización
en un disolvente o mezcla de disolventes adecuados. Por
ejemplo, las sales de dicitclohexilamina se recristalizan
convenientemente en una mezcla de éter y pentano.

20 Análogamente, los compuestos de Fórmula I pueden ser
preparados por reacción de un éster activo carbónico de un
carbinol acetilénico representado por la Fórmula II, donde
 R_3 es fenoxi o fenoxi sustituido.

25 Cuando se hace reaccionar con un aminoácido el és-
ter fenilcarbónico de Fórmula II, la reacción se lleva a
cabo de la siguiente forma. El aminoácido y el éster car-
bónico de carbinol acetilénico se disuelven en una mezcla
disolvente constituída por agua y un codisolvente, como un
disolvente alcohólico, por ejemplo isopropanol, terc-buta-
30 nol, alcohol isoamílico o cualquier otro disolvente alco-
hólico adecuado. Se añade un aceptor de haluro de hidróge-

-13-
401763



1 no, como una amina terciaria, por ejemplo trietilamina, y
la mezcla de reacción se agita durante 2 a 8 horas aproxima-
madamente, a una temperatura mantenida entre unos 45° y
75°C.

5 El aminoácido protegido en el grupo amino producido
en la reacción es aislado por evaporación de la mezcla pro-
ducto de reacción a vacío y disolución del residuo oleoso
en agua. La solución se acidula a pH 3 aproximadamente con
un ácido orgánico, por ejemplo ácido acético o ácido cítri-
co y el precipitado oleoso se extrae con acetato de etilo.
10 Se lava y seca el extracto y después se evapora a vacío pa-
ra formar el aminoácido protegido en el radical amino con
un grupo alquilcarbiniloxycarbonilo, ya sea como residuo
oleoso o como residuo sólido. El producto de reacción así
obtenido puede ser purificado de nuevo como aminoácido.
15 N-protégido en forma de ácido libre o como sal amónica del
mismo, en la forma descrita en la preparación de los ésteres
halofórmicos.

20 La preparación de aminoácidos N-protégidos ilustra-
tivos y sus sales amónicas está descrita con detalles más
específicos en los ejemplos dados más adelante.

Los aminoácidos protegidos así obtenidos son útiles
en la síntesis de péptidos. El grupo carboxilo libre del
aminoácido protegido en el radical amino puede hacerse reac-
cionar con otro aminoácido o péptido que contenga un grupo
25 amino libre para formar la unión amida de un dipéptido o
de un péptido superior. Esta reacción se lleva a cabo común-
mente preparando primero un éster activo del aminoácido
condensante. Uno de los ésteres que pueden ser empleados
es el éster 2,4,5-triclorofenílico del aminoácido N-rote-
30

40 1763



1

gido.

5

10

Alternativamente, puede prepararse en primer lugar el éster activo de un aminoácido no protegido y el grupo amino del mismo puede ser protegido después mediante el grupo protector alquilcarbiniloxycarbonilo. Los ésteres activos de los aminoácidos que son comúnmente empleados en la síntesis de péptidos pueden ser también utilizados en esta invención. Por ejemplo, pueden emplearse los ésteres preparados con N-hidroxisuccinimida, ésteres fenílicos sustituidos y especialmente los ésteres 2,4,5-triclorofenílico y pentaclorofenílico.

15

20

25

30

En uno de sus aspectos, esta invención proporciona un método conveniente de preparación de un éster activo fenílico o fenílico sustituido de un aminoácido protegido con un grupo alquilcarbiniloxycarbonilo. De acuerdo con este aspecto de la invención, cuando se emplea un éster carbónico de carbinol acetilénico de Fórmula II (siendo R_3 fenoxi o fenoxi sustituido) en la preparación de un aminoácido protegido con un grupo alquilcarbiniloxycarbonilo, el producto secundario de la reacción es fenol o un fenol sustituido. El producto secundario fenólico presente en la mezcla obtenida en la reacción, junto con el aminoácido protegido con alquilcarbiniloxycarbonilo, puede reaccionar después con la función ácido carboxílico libre del aminoácido N-protegido agregando a la mezcla de reacción un reactivo de condensación adecuado, tal como dicitclohexilcarbo-di-imida para formar el éster activo fenílico o fenílico sustituido del aminoácido protegido en el radical amino con un grupo alquilcarbiniloxycarbonilo. El éster de aminoácido protegido con alquilcarbiniloxycarbonilo

401763



1 es aislado y purificado después para su empleo posterior en la síntesis de péptidos.

5 Por ejemplo, un éster carbónico de carbinol acetilénico de Fórmula II se hace reaccionar con el aminoácido deseado en la forma antes descrita para producir una mezcla de reacción que comprende el aminoácido protegido en el radical amino con un grupo alquilcarboniloxycarbonilo y un fenol o fenol sustituido. La mezcla se evapora hasta formar un residuo que después se trata con agua y se acidula a 10 pH 3 aproximadamente, utilizando un ácido débil como el ácido cítrico. La solución acidulada se extrae con un disolvente orgánico adecuado, como acetato de etilo, y el extracto se lava y seca. Se evapora el extracto para dar una mezcla oleosa que comprende el aminoácido N-protégido y el fenol o fenol sustituido. Al residuo se añade un pequeño volumen 15 de acetato de etilo y la solución así obtenida se enfría a una temperatura de unos 0-5°C. A la solución fría se añade un agente de condensación, como dicitclohexil-carbo-dimidida, y la mezcla de reacción se agita durante la noche mientras se calienta a la temperatura ambiente. Se filtra 20 la urea secundaria precipitada formada en la reacción y el filtrado se evapora para dar el éster carbónico del aminoácido N-protégido en forma de residuo crudo. El residuo puede ser purificado, obteniéndose el producto de reacción en forma cristalina por cristalización en un disolvente adecuado. 25 Los disolventes preferidos para la cristalización de estos ésteres producto de reacción son las mezclas de acetato de etilo y pentano.

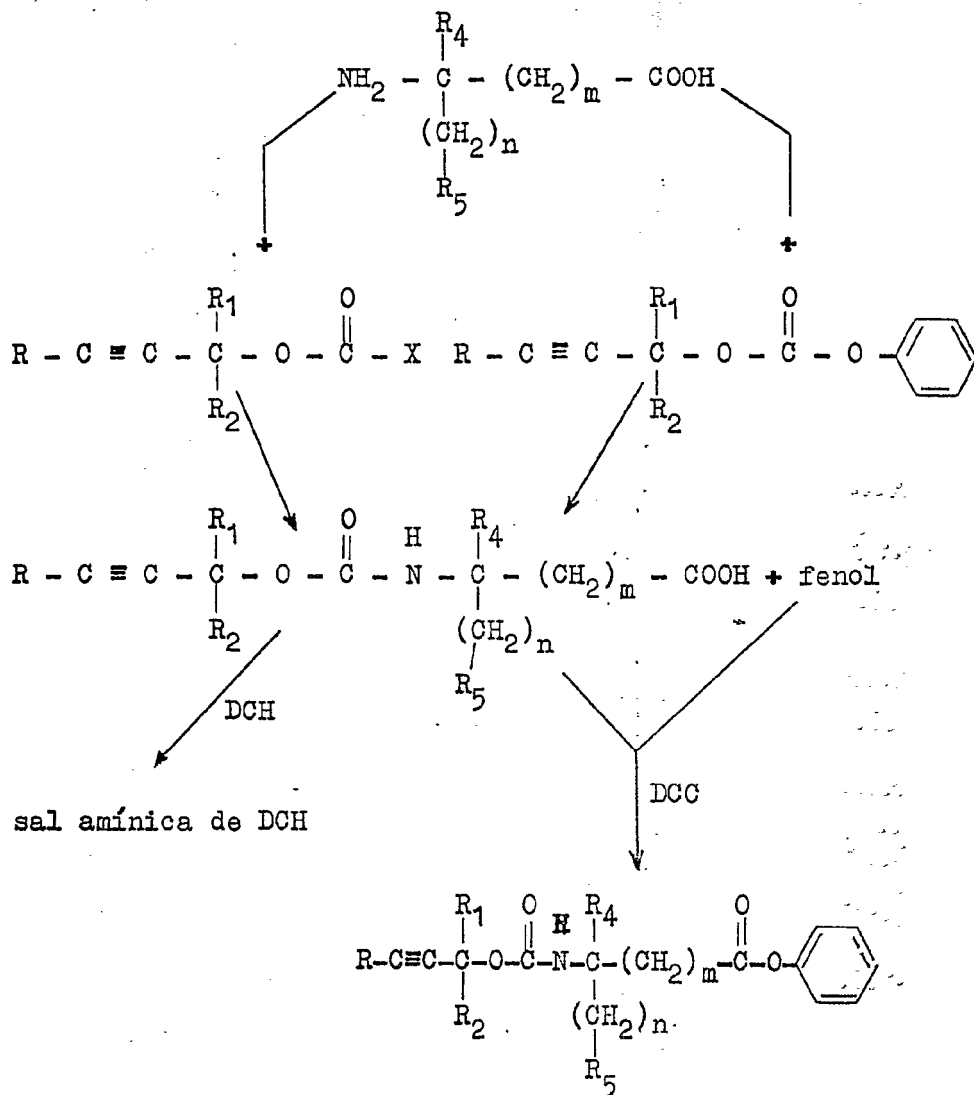
30 Los métodos antes descritos están ilustrados en el siguiente Esquema de Reacción General I.



1

Esquema de Reacción I

5



10

15

20

X es cloro o flúor

DCC es dicitclohexil-carbo-di-imida

DCH es dicitclohexilamina

25

Cualquiera de los aminoácidos conocidos puede ser protegido mediante esta invención. Por ejemplo: α-aminoácidos monocarboxílicos como glicina, alanina, valina, leucina, isovalina, fenilalanina, tirosina, serina, cisteina y metionina; ácidos monoamino-dicarboxílicos como arginina, lisina

30

4071763



1 y ornitina; glutamina y asparagina; y los aminoácidos hete-
rocíclicos sustituidos como histidina, triptófano y prolina.
Análogamente, los β -aminoácidos como ácido α -fenil- β -amino-
propiónico, ácido β -fenil- β -aminopropiónico, ácido β -amino-
5 propiónico, ácido β -aminobutírico, ácido β -aminocaproico,
ácido omega-hidroxi- β -aminovalérico, ácido epsilon-hidroxi-
 β -aminocaproico, ácido β -aminoisovalérico, ácido β -amino-
gamma-guanidinovalérico, ácido β -aminoglutárico, ácido β -ami-
no-gamma-etilmercaptobutírico y ácido β -amino-gamma-metil-
10 mercaptobutírico.

Los siguientes son ejemplos de aminoácidos y ésteres
de esta invención protegidos con un grupo alquilcarbinil-
oxicarbonilo.

N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-glicina
15 N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-alanina
N-(3-metil-1-pentin-3-oxicarbonil)-L-valina
N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-D-fenilglicina
N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionina
N-(1-cloro-3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionina
20 ácido N-(1-fenil-3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-aspartico
N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-cisteína
N-(1-etinilciclohexil-1-oxicarbonil)-L-metionina
N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-fenilalanina
N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-triptófano
25 N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-S-tritil-L-cisteína
N-(3-metil-1-pentin-3-oxicarbonil)-S-bencil-L-cisteína
N-(1-etinilciclopentil-1-oxicarbonil)-S-benzohidril-L-
cisteína
N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-O-terc-butil-L-serina
30 N-(1-fenil-3-metil-1-pentin-3-oxicarbonil)-O-bencil-L-serina



- 1 N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)tirosina
α-N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-ornitina
α-N-(3-metil-1-pentin-3-oxicarbonil)-E-terc-butiloxicar-
bonilamino-L-lisina
- 5 α-N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)histidina
ácido N-(3-etil-1-pentin-3-oxicarbonil)glutámico
N-(3-metil-1-hexin-3-oxicarbonil)isovalina
N-(1-etinilcicloheptil-1-oxicarbonil)alanina,
N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)metionina y
- 10 las sales de metales alcalinos, metales alcalino-térreos y
amínicas de los mismos, como las sales de litio, sodio,
potasio, calcio, dietilamina, dicitclohexilamina, trietilén-
diamina y dibencilamina y los ésteres activos de los mismos
como ésteres p-nitrobencílico, pentaclorofenílico, penta-
15 fluorfenílico, 2,4,5-triclorofenílico y los ésteres forma-
dos con N-hidroxisuccinimida.

20 Como ya se ha descrito, los aminoácidos protegidos
con un grupo alquilcarbiniloxicarbonilo en muchos casos
pueden ser aislados y purificados en forma de sus sales amí-
nicas. Una amina preferida para la preparación de las sales
amínicas de los aminoácidos N-protegidos es la dicitclohexil-
amina. La siguiente Tabla I contiene una lista ilustrativa
de las sales de dicitclohexilamina de aminoácidos N-protegi-
dos, proporcionadas por esta invención.


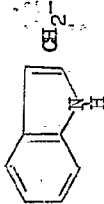
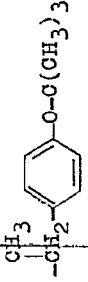
25

30

401763

18 FEB 19 1963

Salas de dicitohexilamina (DCHA) de aminoácidos protegidos con un grupo alquilcarbamiloxycarbonilo

Aminoácido inicial	R	R ₁	R ₂	R'	P.f. °C
L-metionina	H	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	117-119
L-fenilalanina	H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ - 	205-206
L-metionina	H	-(CH ₂) ₅ -	-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	119-121
L-metionina	Cl	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	115-117
L-metionina	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	132-133,5
S-tritil-L-cisteína	H	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -S-O(CH ₂) ₃	177,5-179
O-terc-butil-L-serina	H	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -O-C(CH ₃) ₃	146-148
L-valina	H	CH ₃	CH ₃	-CH(CH ₃) ₂	126-128
L-glutamina	H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -C(=O)-NH ₂	152-154
L-triptófano	H	CH ₃	CH ₃		178,5-180
D-α-fenilglicina	H	CH ₃	CH ₃	C ₆ H ₅ -	138-140
O-terc-butil-L-treonina	H	CH ₃	CH ₃	-C(CH ₃) ₃	160-162
O-terc-butil-L-tirosina	H	CH ₃	CH ₃		125-128

1

5

10

15

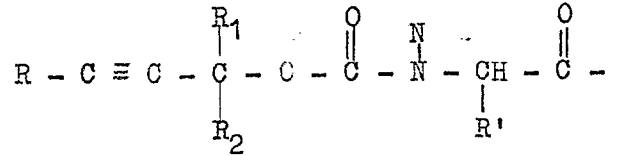
20



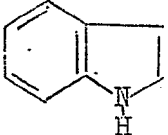
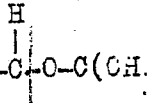

25

30

401763

Sales de dicitohexilamina (DCHA) de aminoácidos protegidos con



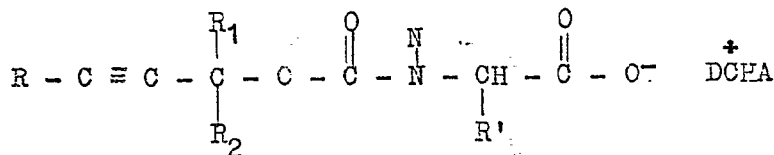
Aminoácido inicial	R	R ₁	R ₂	R'
L-metionina	H	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ SCH
L-fenilalanina	H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ - 
L-metionina	H	-(CH ₂) ₅ -		-(CH ₂) ₂ -SC
L-metionina	Cl	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -SC
L-metionina	C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -SC
S-tritil-L-cisteína	H	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -S-C
O-terc-butil-L-serina	H	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -O-C
L-valina	H	CH ₃	CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
L-glutamina	H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ - 
L-triptófano	H	CH ₃	CH ₃	
D-α-fenilglicina	H	CH ₃	CH ₃	C ₆ H ₅ -
O-terc-butil-L-treonina	H	CH ₃	CH ₃	
O-terc-butil-L-tirosina	H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ - 


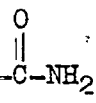
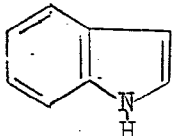

25

30



na (DCHA) de aminoácidos protegidos con un grupo alquilcarbiniloxycarbonilo



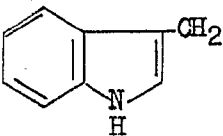
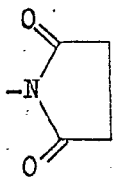
R	R ₁	R ₂	R'	p.f. °C
H	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ SCH ₃	117-119
H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ - 	205-206
H	-(CH ₂) ₅ -		-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	119-121
Cl	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	115-117
C ₆ H ₅	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -SCH ₃	132-133,5
H	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -S-C(=O)-C(CH ₃) ₃	177,5-179
H	CH ₃	CH ₃	-(CH ₂) ₂ -O-C(CH ₃) ₃	146-148
H	CH ₃	CH ₃	-CH(CH ₃) ₂	126-128
H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -CH ₂ - 	152-154
H	CH ₃	CH ₃	 -CH ₂ -	178,5-180
H	CH ₃	CH ₃	C ₆ H ₅ -	138-140
H	CH ₃	CH ₃	-C(=O)-O-C(CH ₃) ₃	160-162
H	CH ₃	CH ₃	-CH ₂ -  -O-C(CH ₃) ₃	125-128



1 La siguiente Tabla II contiene una lista ilustrati-
 va de ésteres activos de aminoácidos protegidos con alqui-
 nilcarbiniloxicarbonilo en la que se ilustran dos grupos
 éster preferidos, a saber, los ésteres 2,4,5-triclorofeni-
 5 licos y el éster derivado de N-hidroxisuccinimida.

TABLA II

Esteres activos de aminoácidos N-(3-metil-1-butin-3-oxi-
carbonil)-protegidos

Aminoácido inicial	R'	R''	p.f. °C
L-metionina	$-(CH_2)_2-S-CH_3$	2,4,5-TCP ¹	97-98
S-benzohidril- L-cisteína	$-CH_2-S-CH(\emptyset)_2$	2,4,5-TCP	128-131
S-bencil-L-cis- teína	$-CH_2-S-CH_2\emptyset$	2,4,5-TCP	59-62
D-α-fenilglicina	C_6H_5-	2,4,5-TCP	69-71
L-triptófano		2,4,5-TCP	123-125
L-fenilalanina	$-CH_2C_6H_5$		128-130

1/2,4,5-TCP = 2,4,5-triclorofenilo.

25

Como ya se ha mencionado, los aminoácidos N-prote-
 gidos obtenidos mediante esta invención son útiles en la
 síntesis de los péptidos. Por consiguiente, esta invención
 proporciona un método mejorado para la síntesis de péptidos.
 30 Los aminoácidos N-protegidos de Fórmula I pueden reaccionar

40 17 63



1 con otro aminoácido para formar un dipéptido o, alternati-
vamente, el aminoácido N-protegido puede reaccionar con un
péptido previamente elaborado para formar un péptido que
5 contiene el aminoácido adicional proporcionado por el amino-
ácido N-bloqueado. La copulación del aminoácido N-protegido
con otro aminoácido o péptido que contenga un grupo amino
libre se lleva a cabo por métodos conocidos y practicados
en la técnica de los péptidos sintéticos. Por ejemplo, los
aminoácidos N-protegidos de Fórmula II pueden ser copulados
10 con el grupo amino de otro aminoácido o aminopéptido por
reacción del radical ácido carboxílico del aminoácido N-pro-
tegido, en forma de éster activo, anhídrido mixto, haluro
de ácido o mediante el uso de dicitclohexil-carbo-di-imida
y métodos de copulación de péptidos similares que son co-
múnmente empleados por los expertos en la técnica.

15 Después de la síntesis del dipéptido o polipéptido
deseado, el grupo alquinilcarbiniloxycarbonilo protector
del radical amino se separa fácilmente por hidrogenólisis
catalítica. El grupo acetilénico protector del radical ami-
no de esta invención es un grupo amino bloqueante especial-
20 mente valioso en la síntesis de los péptidos debido a su
fácil separación a pH neutro por hidrogenólisis catalítica,
en condiciones suaves de temperatura y presión. El grupo ami-
noprotector de este invento es un grupo bloqueante del radi-
cal amino especialmente interesante porque es fácilmente se-
25 parado en presencia de los grupos funcionales que contienen
azufre que pueden encontrarse en la misma molécula de pépti-
do.

30 Debido a la fácil escisión a pH neutro de los gru-
pos protectores del radical amino de esta invención, otros

40 1763



1 grupos bloqueantes dentro de la misma molécula de péptido que son separados por hidrólisis ácida o básica permanecen prácticamente intactos mientras que el grupo alquilcarbonyloxycarbonílico es selectivamente eliminado.

5 La hidrogenolisis catalítica de los grupos amino-protectores aquí descritos se lleva a cabo en un disolvente inerte, a una temperatura comprendida entre 15° y 45°C aproximadamente y bajo una presión de hidrógeno entre 1 atmósfera y 5 atmósferas aproximadamente, en presencia de un catalizador de hidrogenación. Un catalizador preferido es el paladio sobre carbón, por ejemplo paladio al 5 ó 10 % en carbón. Pueden emplearse otros catalizadores de hidrogenación como platino, óxido de platino, rodio y rutenio en forma de catalizadores colocados sobre los soportes catalíticos comúnmente utilizados, tales como carbón, alúmina, gel
10 de sílice y similares. Análogamente, pueden utilizarse estos catalizadores que contienen paladio en forma metálica finamente dividida sin soporte.

15 En la hidrogenolisis pueden utilizarse disolventes como alcoholes, éteres y ésteres, por ejemplo metanol, etanol, isopropanol, tetrahidrofurano, dioxano, acetato de etilo, acetato de amilo y disolventes similares. Análogamente pueden emplearse disolventes como dimetilformamida, dimetilsulfóxido, ácido acético acuoso y otros disolventes comúnmente empleados.

20 La reacción se lleva a cabo preferiblemente a la temperatura ambiente y a una presión de hidrógeno comprendida entre 15 y 45 psi (1 y 3 kg/cm²) en presencia de alrededor de 0,05-0,75 g de paladio al 5 % en carbón por milimol de péptido. Preferiblemente se emplean 0,5 g de paladio
25
30

40²³1763



1 al 5 % en carbón por milimol de péptido.

5 La hidrogenolisis puede realizarse en un aparato de hidrogenación Parr o en una vasija de vidrio adecuada, por ejemplo un vaso de precipitados abierto o un matraz de fondo redondo u otra vasija de reacción. Cuando la hidrogeno-
10 lisis se efectúa en un matraz o en un vaso abierto, el catalizador se suspende en una solución que contiene el péptido y se hace burbujear hidrógeno gaseoso a través de la solución agitada. De la solución reaccionante se desprende dióxido de carbono a medida que transcurre la hidrogenolisis y puede ser recogido en una solución de hidróxido bórico para determinar cuando se ha completado la reacción de hidrogeno-
15 lisis.

20 Cuando en la Fórmula II, R representa cloro, la hidrogenolisis del grupo alquilcarbiniloxycarbonilo va acompañada de hidrogenolisis del sustituyente cloro, con formación de cloruro de hidrógeno. El cloruro de hidrógeno así producido queda disponible para la preparación in situ del hidrocioruro del grupo amino libre resultante de la eliminación del grupo protector.

25 El grupo protector cloroacetilénico, por ejemplo el grupo 1-cloro-3-metil-1-butin-3-oxycarbonilo, es especialmente útil en la síntesis de péptidos glutamínicos N-terminales. Los restos de péptidos glutamínicos experimentan fácilmente una ciclación intramolecular para formar el resto indeseable piroglutamínico dentro del péptido.

30 Cuando se emplea un grupo bloqueante cloroacetilénico de esta invención, la generación simultánea de cloruro de hidrógeno en la hidrogenolisis del grupo bloqueante da lugar a un resto glutamina del péptido y evita la ciclación

13 AGO



401763

1 del resto de glutamina.

5 El grupo protector alquinilcarbiniloxicarbonilo es un grupo amino-protector especialmente útil en la síntesis de péptidos ya que puede ser hidrogenolizado selectivamente de los péptidos en presencia de los grupos protectores comúnmente empleados para proteger los radicales ácido carboxílico, amino, hidroxilo y tiol que pueden encontrarse en el mismo péptido. Por ejemplo, el grupo alquinilcarbiniloxicarbonilo puede ser separado por el proceso de hidrogenolisis antes descrito en presencia de grupos amino-protectores como terc-butiloxicarbonilo (t-BOC) y adamantiloxicarbonilo, por ejemplo el grupo E-amino protegido con t-BOC de la lisina y el grupo t-BOC- δ -amino de la ornitina.

15 El grupo acetilénico amino-protector puede ser separado selectivamente de los péptidos que contienen grupos azufre junto con grupos protectores sensibles a la hidrogenolisis, por ejemplo los ésteres bencílicos y los éteres bencílicos.

20 Análogamente, el grupo amino-protector alquinilcarbiniloxicarbonílico puede ser separado por hidrogenolisis catalítica en condiciones de pH neutro, en presencia de un grupo sulfhidrilo protegido como, por ejemplo, cisteína S-protegida. Estos grupos S-protectores son, por ejemplo, el grupo tetrahidropiraniolo, el grupo p-metoxibencilo [Bull. Chem. Soc. Japan, 37 (3) 433 (1964)], el grupo isobutiloximetilo [J. Org. Chem. 35 315 (1970)]; [J. Chem. Soc. 3832 (1964)], el grupo β, β -diatoxicarboniletilo, el grupo S-etilmercapto [Bull. Chem. Soc. Japan, 40, 2913 (1969)], el grupo alcoxicarbonilo y benciloxicarbonilo [J. Am. Chem. Soc. 85, 1337 (1963)], el grupo alquilcarbamilo [Helv. Chim. Acta

30



1 49, (14) 83 (1966)], el grupo acetamidometilo [Tetrahedron
Letters nº 26, 3057 (1968)], el grupo terc-butilo y grupos
similares protectores del tiol que son comúnmente empleados
en la síntesis de péptidos.

5 El grupo amino-protector alquilcarbiniloxycarboní-
lico es una herramienta especialmente valiosa en la sínte-
sis de péptidos, ya que puede ser separado del grupo amino
de los péptidos que contienen un grupo azufre, por ejemplo
metionina, cisteína y péptidos que comprenden estos amino-
10 ácidos.

Debe observarse que en la anterior Fórmula III la
porción representada entre corchetes comprende un resto
aminoácido. Debe entenderse que los valores de R_6 , R_7 , m
y n entre los restos aminoácidos individuales pueden ser
15 iguales o diferentes.

Cuando en la anterior Fórmula III, R_5 representa un
sustituyente protegido, por ejemplo un sustituyente mercap-
toalquilo inferior protegido, estas funciones protegidas
tienen el mismo significado definido en la Fórmula I.

20 Los péptidos de Fórmula III que son preparados con
los aminoácidos naturales son un grupo preferido de péptidos
útiles en una amplia variedad de formas muy conocidas en
la química de los péptidos. Estos péptidos que contienen
restos aminoácido naturales pueden ser empleados en la sín-
25 tesis de polipéptidos conocidos, por ejemplo glucagon, con
propiedades fisiológicas conocidas. Los compuestos de Fór-
mula III preparados con aminoácidos que no se encuentran en
la naturaleza pueden ser utilizados en la síntesis de polí-
meros solubles de peso molecular variable que deben ser em-
30 pleados como superficies de revestimiento.

- 26 -
401763



1 De acuerdo con la práctica de esta invención, el
grupo amino de un aminoácido es protegido haciendo reaccio-
nar el aminoácido con un haloformiato acetilénico o un car-
bonato acetilénico representado por la Fórmula II para for-
5 mar el aminoácido N-protegido de Fórmula I. La función áci-
do carboxílico del aminoácido N-protegido es convertida des-
pués en un éster activo, un anhídrido mixto o un haluro de
acilo. Alternativamente, la función ácido carboxílico del
aminoácido puede ser convertida en primer lugar en un éster
10 activo, un anhídrido mixto o un haluro de acilo y a conti-
nuación el grupo amino puede ser protegido por reacción con
un éster haloformico o carbónico acetilénico de Fórmula II.
La conversión de la función ácido carboxílico en estos de-
rivados se efectúa por métodos comúnmente empleados, muy
15 conocidos por los expertos en esta técnica. En muchos casos,
el aminoácido N-protegido proporcionado por esta invención
puede ser copulado para formar un péptido sin derivatizar
la función ácido carboxílico, llevando a cabo la reacción
de copulación mediante un reactivo de condensación como di-
20 ciclohexil-carbo-di-imida.

El aminoácido N-protegido, o su éster activo, anhí-
drido mixto o haluro de acilo así obtenido se hace reaccio-
nar después con otro aminoácido o aminopéptido para formar
el péptido deseado representado por la Fórmula III, donde
25 el grupo amino terminal está protegido con un grupo alqui-
nilcarbiniloxicarbonilo. Otros grupos reactivos que pueden
encontrarse en el aminoácido o aminopéptido son conveniente-
mente protegidos por grupos protectores como los comúnmente
empleados en la síntesis de péptidos.

30 El grupo protector alqunilcarbiniloxicarbonilo N-ter-

-27-
401763



1 minal del dipéptido o polipéptido así obtenido es después
separado selectivamente por hidrogenolisis catalítica sobre
paladio al 5 % en carbón, de acuerdo con la reacción de
desbloqueo previamente discutida.

5 El aminopéptido así preparado puede ser aislado y
purificado por técnicas comúnmente empleadas, por ejemplo
por extracción, recristalización o adsorción, por ejemplo
por cromatografía de columna o por cromatografía preparati-
va en capa delgada.

10 El dipéptido o polipéptido conteniendo un grupo amino
N-terminal libre así aislado puede reaccionar después con
otro aminoácido protegido por el grupo protector alquínil-
carbiniloxycarbonilo de esta invención para obtener un tri-
péptido o un polipéptido que ahora contiene al último amino-
15 ácido en la cadena péptida. El grupo protector N-terminal
es después separado por el proceso de hidrogenolisis cata-
lítica previamente descrito para formar el aminotripéptido
o aminopolipéptido N-terminal libre.

20 Por consiguiente, este método, que comprende las eta-
pas consecutivas de copular un aminoácido N-prottegido de
Fórmula I con otro aminoácido o aminopéptido seguido de hi-
drogenolisis catalítica del grupo protector acetilénico del
producto copulante, puede ser empleado para la síntesis de
péptidos de cualquier longitud de cadena deseada y de cual-
quier composición deseada de aminoácidos.

25 El método de síntesis de péptidos aquí descrito es
un método especialmente útil debido a las interesantes ca-
racterísticas y ventajas del grupo amino-protector alquínil-
carbiniloxycarbonilo. Como se ha discutido previamente, este
grupo protector es fácilmente separado por hidrogenolisis
30

40-1763



1 catalítica a pH neutro. Por consiguiente, cuando se separa
el grupo protector acetilénico quedan intactos otros grupos
protectores lábiles ácidos o básicos del péptido elaborado.
Análogamente, el grupo N-protector de esta invención es
5 fácilmente separado en presencia de grupos funcionales que
contienen azufre.

En muchos casos, el grupo protector alquilcarbinil-
oxicarbonilo, debido a su inestabilidad frente a la hidro-
genolisis catalítica, puede ser separado selectivamente en
10 presencia de otros grupos protectores pero también son sus-
ceptibles de separación por hidrogenolisis catalítica. Dos
de estos grupos protectores comúnmente empleados son los
grupos bencilo y benciloxicarbonilo (carbобензохи). Por
ejemplo, cuando el éster etílico de N-carbобензохи-L-metio-
15 nilglicina es sometido a condiciones de hidrogenolisis
(1,1 g de compuesto en 25 ml de metanol conteniendo 3 ml
de HCl 1 N, en presencia de 0,3 g de paladio al 5 % en car-
bón), el material de partida se recupera al cabo de 4 horas.
Bajo las mismas condiciones de hidrogenolisis, el éster etí-
20 lico de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionilglicina
forma éster etílico de L-metionilglicina con un rendimiento
del 80 % aproximadamente.

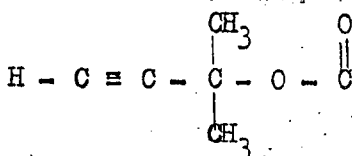
El grupo protector alquilcarbiniloxicarbonilo de
esta invención también puede ser separado del producto pép-
25 tido, un compuesto de Fórmula III, por hidrólisis ácida. La
escisión ácida puede ser llevada a cabo haciendo reaccionar
el péptido N-protégido con ácido trifluoracético o con una
solución 1 N de cloruro de hidrógeno en ácido acético gla-
cial. Por consiguiente, cuando el péptido N-protégido de
30 Fórmula III es el producto final deseado del método de sín-



1 tesis de esta invención, otros grupos protectores ácidos lá-
 biles pueden ser separados simultáneamente con la separa-
 ción ácida del grupo alquinilcarbiniloxicarbonilo. Estos
 grupos bloqueantes comúnmente empleados, como el grupo terc-
 5 butiloxicarbonilo, el grupo O-terc-butilo y el grupo éster
 terc-butílico, pueden ser separados al mismo tiempo que se
 realiza la hidrólisis ácida del grupo alquinilcarbiniloxi-
 carbonilo.

10 Sin embargo, cuando el compuesto de Fórmula III es
 un intermediario en la síntesis de un péptido de peso mo-
 lecular más alto, puede conseguirse la separación selectiva
 del grupo alquinilcarbiniloxicarbonilo por hidrogenólisis
 catalítica, como se ha discutido anteriormente, permanecien-
 do intactos los grupos protectores lábiles del ácido como
 15 los éteres y ésteres terc-butílico y los grupos amino prote-
 gidos con t-BOC, para las posteriores reacciones de copula-
 ción.

20 Un grupo bloqueante preferido de esta invención es
 el grupo protector 3-metil-1-butil-3-oxicarbonilo represen-
 tado por la fórmula:



25 Los siguientes ejemplos se utilizan para ilustrar la
 invención y no se pretende que limiten el alcance de la mis-
 ma.

EJEMPLO 1

30 Se hace reaccionar la amida de L-aspartil-L-fenilalani-
 na, preparada en la forma descrita por Morely, J. Chem.

401703

13



1 Soc. 1966, 555, con éster 2,4,5-triclorofenílico de N-(3-
metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionina en dimetilformamida
a 0°C, en presencia de trietilamina, para formar la amida de
5 N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionin-L-aspartil-L-
fenilalanina con un rendimiento del 61 %. El producto así
obtenido se disuelve en ácido acético al 80 % y la solución
se hidrogena durante 2,5 horas a la temperatura ambiente,
bajo una atmósfera de hidrógeno y en presencia de paladio al
10 5 % en carbón, para formar el tripéptido, amida de
L-metionil-L-aspartil-L-fenilalanina, con un rendimiento del
62 %.

EJEMPLO 2

15 El tripéptido preparado en el Ejemplo 1 se hace reac-
cionar después con éster 2,4,5-triclorofenílico de N-(3-me-
til-1-butin-3-oxicarbonil)-L-triptófano (de Fórmula I) en
el disolvente dimetilformamida, en presencia de trietilamina
y a una temperatura comprendida aproximadamente entre -20°
y 0°C, para formar el tetrapéptido N-protégido de Fórmula
20 III, amida de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-triptofil-
L-metionil-L-aspartil-L-fenilalanina. La hidrogenolisis ca-
talítica del tetrapéptido N-bloqueado sobre paladio al 5 %
en carbón a la temperatura ambiente proporciona el conocido
tetrapéptido Tetragastrina.

25 En los anteriores Ejemplos 1 y 2, la copulación del
aminoácido N-protégido con los aminopéptidos se lleva a ca-
bo mediante el éster activo del aminoácido N-protégido. Al-
ternativamente, la copulación puede efectuarse por otros
métodos corrientes, por ejemplo por reacción de un anhídrido
30 mixto del aminoácido N-protégido con el aminopéptido.

401763



1

EJEMPLO 3

5

10

15

20

25

30

Los compuestos de Fórmula I en forma de sales amínicas, por ejemplo sales de dicitclohexilamina, pueden ser copulados con otros aminoácidos o aminopéptidos efectuando la reacción de copulación con el reactivo condensante dicitclohexil-carbo-di-imida. Por ejemplo, la sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionina se hace reaccionar con hidrocioruro de éster metílico de β -bencil-L-aspartil-L-fenilalanina en un disolvente inerte, como los hidrocarburos clorados y preferiblemente cloruro de metileno, en presencia de 1 equivalente de dicitclohexil-carbo-di-imida para obtener el péptido N-protégido de Fórmula III, éster metílico de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionin- β -bencil-L-aspartil-L-fenilalanina. La hidrogenólisis catalítica del péptido bloqueado así preparado sobre paladio al 5 % en carbón proporciona el tripéptido éster metílico de L-metionin-(β -bencil)-L-aspartil-L-fenilalanina, que puede ser aislado como sal hidrocioruro cristalina.

Los aminoácidos N-protégidos y los péptidos N-protégidos de esta invención son útiles para la preparación de una amplia variedad de péptidos. Por ejemplo, pueden ser empleados en la síntesis de fragmentos péptidos en la síntesis del agente hiperglicémico glucagon. Análogamente, los compuestos y el método de esta invención pueden ser utilizados en la síntesis de péptidos conocidos como oxitocina, vasopresina, secretina, insulina, gastrina, proinsulina, tirocalcitonina, factor liberador de corticotropina (CFR), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), caeurulina y colecistquinina.

La siguiente Tabla III contiene una lista ilustrati-

401763



1 va de los péptidos representados por la Fórmula II y prepa-
 rados de acuerdo con el método de esta invención. Por razo-
 nes de brevedad, se emplea la nomenclatura recomendada para
 los aminoácidos y péptidos por la IUPAC - IUB
 5 Commission on Biochemical Nomenclature. El grupo protector
 3-metil-1-butin-3-oxicarbonilo, que es un grupo acetilénico
 bloqueante preferido de esta invención, es ilustrativo
 de los representados por las Fórmulas I y II y está indica-
 do por la designación MBOC (metilbuteniloxicarbonilo). La
 10 designación PBOC se refiere al grupo 3-metil-1-fenil-1-
 butin-3-oxicarbonilo y ECOC se refiere al grupo protector
 1-etinilciclohexil-1-oxicarbonilo.

TABLA III

Péptidos protegidos con grupos alquilcarbiniloxicarbonilo

Número	Péptido
1.	MBOC-L-Trp-L-Leu, éster metílico ¹
2.	MBOC-O-t-butyl-L-Ser-L-Arg-L-Arg-L-Ala-Gln-β-t-butyl-L-Asp.2HCl
3.	MBOC-S-benzohidril-L-Cys-Gly, éster etílico
4.	MBOC-S-tritil-L-Cys-Gly, éster etílico
20	5. MBOC-L-Phe-S-tritil-L-Cys-Gly, éster etílico
6.	MBOC-L-Trp-L-Met-L-Asp-L-Phe, amida
7.	MBOC-L-Met-L-Asp-L-Phe, amida
8.	MBOC-L-Met-L-Asn-di-O-t-butyl-L-Thr
25	9. MBOC-L-Phe-L-Val-L-Gln-L-Trp-L-Leu-L-Met-L-Asn-di-O-t-butyl-L-Thr
10.	MBOC-L-Phe-L-Val-L-Gln-L-Trp-L-Leu
11.	PBOC-L-Met-L-Asn-di-O-t-butyl-L-Thr ²
12.	ECOC-L-Met-L-Asn-di-O-t-butyl-L-Thr ³
30	13. MBOC-O-t-butyl-L-Ser-L-Arg-L-Arg-L-Ala-L-Gln-L-Trp-L-Leu-L-Met-L-Asn-di-O-t-butyl-L-treoninato. 2HCl

401763

19 AGO 1971



TABLA III (continuación)

Número	Péptido
14.	MBOC-O-t-butyl-L-Ser-L-Ala-L-Glu-L-Ala-L-Phe-L-Pro-L-Leu-Glu-L-Phe
15.	MBOC-S-bencil-L-Cys-O-t-butyl-L-Ser-L-Asn-L-Leu-O-t-butyl-L-Ser-L-Thr
16.	MBOC-L-His-L-Ser-L-Asp-Gly-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Gli-L-Leu-L-Ser-L-Arg-L-Leu-L-Arg-L-Asp
17.	MBOC-L-Lys-L-Arg-L-Pro-L-Pro-Gly-L-Phe-L-Ser-L-Pro-L-Phe-L-Arg
18.	MBOC-O-t-butyl-L-Tyr-O-t-butyl-L-Ser-E-t-BOC-L-Lys-O-t-But-L-Tyr-L-Leu-β-O-t-butyl-L-Asp, ácido
1/	MBOC = 3-metil-1-butin-3-oxicarbonilo
2/	PBOC = 1-fenil-3-metil-1-butin-3-oxicarbonilo
3/	ECOC = 1-etinilciclohexil-1-oxicarbonilo

Los péptidos protegidos con alquilcarbamiloxicarbonilo citados en la Tabla III experimentan hidrogenólisis catalítica como ya se ha descrito para formar los aminopéptidos con excelentes rendimientos. Por ejemplo, el tetrapéptido N-protegido de la línea 6 forma el péptido Tetragastrina con un rendimiento del 66 %.

Los tripéptidos N-protegidos de las líneas 11 y 12 de la Tabla III experimentan hidrogenólisis catalítica para dar el fragmento péptido 27-29 del glucagon, con rendimientos superiores al 60 %. Este fragmento ha sido sintetizado anteriormente con un rendimiento del 84 % por E. Wunsch et al., Chem. Ber. 98, 803 (1965).

Análogamente, el fragmento 22-26 del glucagon se obtiene con excelente rendimiento por hidrogenólisis del pentapéptido N-protegido de la línea 10 así como el fragmento octapéptido 22-29 del glucagon de la línea 9 .

40-1763



1

EJEMPLO 4

5

10

15

20

El fragmento péptido 22-26 del glucagon se prepara de la siguiente forma. Se hace reaccionar el éster 1-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanílico de N-hidroxi-succinimida con L-valil-L-glutaminil-L-triptofil-L-leucina en el disolvente dimetilformamida, a una temperatura comprendida entre -5° y 10°C aproximadamente. La mezcla de reacción se deja calentar lentamente a la temperatura ambiente y después se agita durante 80-90 horas aproximadamente para dar N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanil-L-valil-L-glutaminil-L-triptofil-L-leucina. El pentapéptido N-protégido así preparado se hace reaccionar después con el fragmento tripéptido L-metionil-L-asparaguinil-di-O-terc-butil-L-treoninato en un disolvente como dimetilformamida, por preparación in situ y reacción del éster de N-hidroxi-succinimida del grupo carboxilo de la leucina del pentapéptido, para formar el fragmento octapéptido N-protégido del glucagón (22-29), N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanil-L-valil-L-glutaminil-L-triptofil-L-leucil-L-metionil-L-asparaguinil-di-O-terc-butil-L-treoninato.

EJEMPLO 5

25

30

El fragmento tripéptido del glucagón (27-29) se prepara por reacción de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionina con L-asparaguinil-di-O-terc-butil-L-treoninato en presencia del reactivo copulante N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína (EEDQ) en un disolvente adecuado, como tetrahidrofurano o dimetilformamida, para dar N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionil-L-asparaguinil-di-O-terc-butil-L-treoninato. La hidrogenólisis catalítica del tripéptido N-protégido proporciona el aminotripéptido para la co-



1 pulación con el fragmento pentapéptido N-protégido en la
forma antes descrita.

5 Se realizaron cromatogramas en capa delgada por el
método ascendente en los sistemas disolventes indicados,
sobre placas previamente cubiertas con una capa de gel de
sílice de 0,25 mm de espesor, que se pueden adquirir en la
Brinkman Instruments, Inc., Westbury, N.Y. 11590.

10 La preparación de los ésteres activos halofórmicos
y fenilcarbónicos acetilénicos es ilustrada por los siguien-
tes Ejemplos 6 a 10.

EJEMPLO 6

Fenilcarbonato de 1-fenil-3-metil-1-butin-3-ilo

15 Se enfría a -10°C una solución de 16 g^r (0,1 moles)
de 1-fenil-3-metil-1-butin-3-ol y 12 ml de piridina en
100 ml de cloruro de metileno y se trata gota a gota con
una solución de 15,2 ml de cloroformiato de fenilo en 50 ml
de cloruro de metileno. Una vez completada la adición, la
mezcla se agita a 0° durante 7 horas y se mantiene a 4°C
durante la noche. La mezcla se vierte sobre 150 ml de agua
de hielo y la capa de cloruro de metileno se separa. La
20 capa acuosa se extrae con 75 ml de cloruro de metileno, se
combinan las capas orgánicas, se lavan dos veces con 100 ml
de agua, se secan sobre sulfato sódico anhidro y se evaporan
a vacío hasta formar un aceite. Por cristalización en 100 ml
de éter de petróleo ($30-60^{\circ}$) se obtienen 12,5 g (44,6 %) de
25 fenilcarbonato de 1-fenil-3-metil-1-butin-3-ilo, p.f. $61,5-63^{\circ}\text{C}$.

EJEMPLOS 7 y 8

30 Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 6, se
preparan otros ésteres fenilcarbónicos de la siguiente for-

40⁻³⁶1763



1 ma:

2,4,5-Triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo
por reacción de cloroformiato de 2,4,5-triclorofenilo en
cloruro de metileno con 3-metil-1-butin-3-ol y piridina en
5 cloruro de metileno, p.f. 82-82,5°C.

Análisis para $C_{12}H_9O_3Cl_3$:

Calculado: C, 46,85; H, 2,94; O, 15,62; Cl, 34,59

Encontrado: C, 46,65; H, 3,02; O, 15,82; Cl, 34,51

10 2,4,5-Triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-pentin-3-ilo por reacción de cloroformiato de 2,4,5-triclorofenilo en cloruro de metileno con 3-metil-1-pentil-3-ol y piridina en cloruro de metileno, p.f. 55-57°C.

Análisis para $C_{13}H_{11}O_3Cl_3$:

Calculado: C, 48,55; H, 3,45; Cl, 33,08

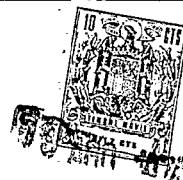
15 Encontrado: C, 48,38; H, 3,69; Cl, 33,42.

EJEMPLO 9

Cloruro de 3-metil-1-butin-3-oxicarbonilo

A una solución de 40 g (~~0,45~~^{0,40} moles) de fosgeno en
400 ml de benceno se añade una solución de 8,9 g (0,106 mo-
20 les) de 3-metil-1-butin-3-ol y 12 g (0,152 moles) de piri-
dina en 200 ml de benceno y 400 ml de éter. La adición se
realiza gota a gota durante un periodo de 2 horas agitando
y enfriando suficientemente para mantener la temperatura
por debajo de 20°C. La mezcla se agita durante 2 horas más
25 a la temperatura ambiente, se filtra el hidrocloreuro de pi-
ridina y el filtrado se vierte sobre 500 ml de agua de hie-
lo. Se separa la capa orgánica, se lava con 500 ml de agua,
se seca sobre sulfato magnésico y se evapora a vacío hasta
30 formar un aceite. El aceite se utiliza sin nueva purifica-
ción.

40⁻³⁷1763



1

EJEMPLO 10

Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 9, se prepara el siguiente compuesto:

5

Cloruro de 1-etinil-1-ciclohexaniloxicarbonilo por reacción de 1-etinil-1-ciclohexanol y piridina en una mezcla de benceno y éter con una solución de fosgeno en benceno.

EJEMPLO 11

10

Sal de dicitclohexilamina de N-(1-etinil-1-ciclohexaniloxicarbonil)-L-metionina

15

A una solución de 11,6 g (77,8 milimoles) de L-metionina y 11,0 g (104 milimoles) de Na₂CO₃ en 165 ml de agua, a una temperatura de 0-5°C, se añaden 90 milimoles de cloruro de 1-etinil-1-ciclohexaniloxicarbonilo y la mezcla se agita durante 20 horas a una temperatura de 0-5°C. La mezcla se extrae tres veces con éter y la solución acuosa se acidula a pH 1 con HCl concentrado. El aceite se extrae tres veces con 100 ml de acetato de etilo cada vez y los extractos se lavan tres veces con 100 ml cada vez de agua, y NaCl al 10 % y se secan sobre sulfato sódico anhidro. El acetato de etilo se evapora a vacío, el aceite residual se disuelve en 100 ml de éter y se añaden 14 g (77,3 milimoles) de N,N-dicitclohexilamina. El éter se evapora a vacío para dar un aceite. El aceite se tritura tres veces con éter de petróleo (30-60°C) y se cristaliza en éter-pentano para dar 18,23 g (52,2 %) de producto, p.f. 119-121°C.

20

25

Análisis para C₂₆H₄₄N₂O₄S:

Calculado: C, 64,97; H, 9,23; N, 5,83; S, 6,67

Encontrado: C, 64,94; H, 9,25; N, 5,74; S, 6,93.

30



1

EJEMPLOS 12 y 13

Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 11, y utilizando las sustancias reaccionantes apropiadas, se preparan los siguientes compuestos:

5

Sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil-L-fenilalanina por reacción de una solución acuosa de carbonato sódico y L-fenilalanina con cloruro de 3-metil-1-butin-3-oxicarbonilo, seguido de reacción con dicitclohexilamina. P.f. 205-206°C, $[\alpha]_D^{25} + 44,351$ (C, 2 % MeOH).

10

Sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionina por reacción de una solución acuosa de L-metionina y carbonato sódico con cloruro de 3-metil-1-butin-3-oxicarbonilo, seguido de reacción con dicitclohexilamina. P.f. 117-119°C.

15

Análisis para $C_{23}H_{40}N_2O_4S$:

Calculado: C, 62,69; H, 9,15; N, 6,36; S, 7,23

Encontrado: C, 62,79; H, 9,00; N, 6,38; S, 7,55

EJEMPLO 14

20

Sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil-D- α -fenilglicina

25

Se calienta a 60-65°C, durante 2 horas, una mezcla de 9,06 g (60 milimoles) de D-fenilglicina, 20,5 g (69 milimoles) de 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo, 21 ml (150 milimoles) de trietilamina, 48 ml de agua y 72 ml de terc-butanol. La solución se evapora a vacío hasta formar un aceite, se añaden 100 ml de agua al aceite y el pH de la mezcla se ajusta a 3 con ácido cítrico al 10 %. El aceite resultante se extrae en 150 ml de acetato de etilo y el extracto se lava con una solución al 10 %

30

40³⁹1763



1 de cloruro sódico y se extrae cinco veces con 100 ml cada
vez de bicarbonato sódico concentrado. La capa de bicarbo-
nato se acidula hasta pH 3 con una solución al 10 % de áci-
do cítrico, se extrae el aceite con 150 ml de acetato de
5 etilo y se seca sobre sulfato sódico anhidro. El acetato de
etilo se evapora a vacío para dar un aceite residual. El
aceite se disuelve en 100 ml de éter y se trata con una so-
lución de 10,8 g (60 milimoles) de dicitohexilamina en
50 ml de éter. Mediante la lenta adición de 100 ml de pen-
tano se separa un precipitado cristalino y al cabo de 2 ho-
ras se recoge para dar 19,5 g (73,5 %) de producto, p.f.
10 138-140°C. $[\alpha]_D^{25} -76,62$ (C, 2 MeOH).

Análisis elemental para $C_{26}H_{38}N_2O_4$:

Calculado: C, 70,56; H, 8,65; N, 6,33; O, 14,46

15 Encontrado: C, 70,46; H, 8,87; N, 6,42; O, 14,31

EJEMPLOS 15-20

Siguiendo el método general del Ejemplo 14, y emplean-
do las sustancias reaccionantes apropiadas, se preparan
otros compuestos de la siguiente forma:

20 Sal de dicitohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxi-
carbonil)-L-triptófano por reacción de una mezcla de 2,4,5-
triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo y L-trip-
tófano, seguido de preparación de la sal de dicitohexil-
amina, p.f. 178,5-180°C.

25 Análisis para $C_{29}H_{42}N_3O_4$

Calculado: C, 70,27; H, 8,34; N, 8,48; O, 12,91

Encontrado: C, 70,02; H, 8,59; N, 8,69; O, 12,78.

30 Sal de dicitohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxi-
carbonil)-L-glutamina por reacción de una mezcla de 2,4,5-
triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo y L-gluta-

40⁴⁰1763



1 mina, seguido de preparación de la sal de dicitclohexilamina.
P.f. 152-154°C.

Análisis para $C_{23}H_{39}N_3O_5$:

Calculado: C, 63,13; H, 8,98; N, 9,60

5 Encontrado: C, 62,98; H, 8,97; N, 9,70

Sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxi-carbonil)-L-valina por reacción de L-valina con 2,4,5-tri-clorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo, seguido de preparación de la sal de dicitclohexilamina. P.f. 126-128°C.

10 Análisis para $C_{23}H_{40}N_2O_4$:

Calculado: C, 67,61; H, 9,87; N, 6,86

Encontrado: C, 67,86; H, 9,80; N, 6,61.

15 Sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxi-carbonil)-L-metionina por reacción de L-metionina con 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo, seguido de preparación de la sal de dicitclohexilamina. P.f. 116-118°C.

Análisis para $C_{23}H_{40}N_2O_4S$:

Calculado: C, 62,69; H, 9,15; N, 6,36; S, 7,28

Encontrado: C, 62,58; H, 9,40; N, 6,17; S, 7,23.

20 Sal de dicitclohexilamina de N-(3-metilbutinil-3-oxi-carbonil)-S-tritil-L-cisteína por reacción de S-tritil-L-cisteína con 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo, seguido de preparación de la sal de dicitclohexilamina. P.f. 177,5-179°C.

25 Análisis para $C_{40}H_{50}N_2O_4S$:

Calculado: C, 73,76; H, 7,70; N, 4,28; O, 9,77;

S, 4,89

Encontrado: C, 72,70; H, 8,00; N, 4,39; O, 10,22;

S, 4,80.

30 Sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxi-

401763



1 carbonil)-(O-terc-butil)-L-serina por reacción de O-terc-
butil-L-serina con 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-metil-
1-butin-3-ilo, seguido de preparación de la sal de dicitclo-
hexilamina. P.f. 146-148°C.

5 Análisis para $C_{25}H_{44}N_2O_5$:

Calculado: C, 66,34; H, 9,80; N, 6,19

Encontrado: C, 66,12; H, 9,70; N, 6,21.

EJEMPLO 21

Sal de dicitclohexilamina de 1-fenil-3-metil-1-butin-3-oxicar-
nil-L-metionina

10 Una solución de 1,49 g (10 milimoles) de L-metionina
en 4,7 ml de Triton (al 40 % en metanol) se evapora a vacío
hasta formar un aceite. El aceite se trata dos veces con
8 ml de dimetilformamida y cada vez se evapora a vacío. Al
15 residuo se añade una solución de 2,8 g (10 milimoles) de fe-
nilcarbonato de 1-fenil-3-metil-1-butin-3-ilo en 8 ml de di-
metilformamida y la mezcla se agita durante 65 horas. La so-
lución se agrega a 90 ml de agua y, después de agitar duran-
te 5 minutos, se extrae dos veces con 35 ml de éter cada vez.
20 La capa acuosa se acidula a pH 3 con ácido cítrico a 0°C y
se continúa agitando durante 30 minutos. Se recoge el sólido,
se disuelve en 75 ml de éter y se seca sobre sulfato sódico
anhidro. La solución etérea seca se evapora a vacío para dar
un aceite residual. El aceite resultante se disuelve en 75
25 ml de éter y la solución se trata con 1,81 g (10 milimoles)
de N,N-dicitclohexilamina y se mantiene a 4°C durante 2,5 ho-
ras. Se filtra el precipitado cristalino, se lava con éter
y se seca a vacío para dar 3,36 g (65 %) de producto, p.f.
132-133,5°C.

30 Análisis elemental para $C_{29}H_{44}N_2O_5$:

40⁴²1763



1 Calculado: C, 67,41; H, 8,58; N, 5,42; S, 6,20

 Encontrado: C, 67,51; H, 8,70; N, 5,31; S, 6,25.

Preparación de ésteres activos de aminoácidos protegidos con
un grupo alquilcarbiniloxicarbonilo

5 EJEMPLO 22

N-(3-Metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-triptofanato de 2,4,5-
triclorofenilo

10 Se calienta a 60-65°C con agitación, durante 1,75 ho-
ras, una mezcla de 4,08 g (20 milimoles) de L-triptófano,
6,84 g (23 milimoles) de 2,4,5-triclorofenilcarbonato de
3-metil-1-butin-3-ilo, 7 ml (50 milimoles) de trietilamina,
16 ml de agua y 24 ml de terc-butanol. La solución se evapo-
ra a vacío hasta formar un jarabe espeso que después se tra-
ta con 30 ml de agua y se acidula a pH 3 con una solución al
15 10 % de ácido cítrico. La solución acidulada se extrae con
dos porciones de 50 ml de acetato de etilo y el extracto
se lava dos veces con 50 ml cada vez de una solución de sal
al 10 %. Un extracto lavado se seca y evapora a vacío hasta
formar un aceite. El aceite se disuelve en 60 ml de acetato
20 de etilo y la solución se enfría a 0°C. A la solución fría
se añaden 4,28 g (21 milimoles) de N,N-diciclohexil-carbo-
di-imida y la mezcla se agita durante la noche mientras se
calienta a la temperatura ambiente. El producto secundario
urea se filtra y el filtrado se evapora a vacío hasta formar
un aceite. Por cristalización en acetato de etilo/pentano se
25 obtienen 7,74 g (78,5 %) de producto, p.f. 123-125°C.

 Análisis elemental para C₂₃H₁₉N₂O₄Cl₃:

 Calculado: C, 55,95; H, 3,88; N, 5,67; Cl, 21,54

 Encontrado: C, 55,88; H, 4,08; N, 5,65; Cl, 21,26.

30

4031763



1

EJEMPLOS 23 a 26

Siguiendo el procedimiento general del Ejemplo 22 empleando las sustancias reaccionantes apropiadas, se preparan otros compuestos de la siguiente forma:

5

N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-D- α -fenilglicinato de 2,4,5-triclorofenilo por reacción de D- α -fenilglicina con 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo y reacción del producto así obtenido con N,N-diciclohexil-carbo-di-imida. P.f. 69-71°C.

10

Análisis para $C_{20}H_{16}NO_4Cl_3$:

Calculado: C, 54,37; H, 3,54; N, 3,27; Cl, 24,23

Encontrado: C, 54,72; H, 3,95; N, 3,42; Cl, 24,20.

15

N-(3-Metil-1-butin-3-oxicarbonil)-S-bencil-L-cisteinato de 2,4,5-triclorofenilo por reacción de S-bencil-L-cisteína con 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo y reacción del producto así obtenido con N,N-diciclohexil-carbo-di-imida. P.f. 59-62°C.

20

Análisis para $C_{22}H_{20}NO_4Cl_3S$:

Calculado: C, 52,76; H, 4,03; N, 2,80; O, 12,78;

Cl, 21,24; S, 6,40

Encontrado: C, 52,66; H, 4,26; N, 2,99; O, 11,75;

Cl, 22,23; S, 6,67.

25

N-(3-Metil-1-butin-3-oxicarbonil)-S-benzohidril-L-cisteinato de 2,4,5-triclorofenilo por reacción de S-benzohidril-L-cisteína con 2,4,5-triclorofenilcarbonato de 3-metil-1-butin-3-ilo y reacción del producto así obtenido con N,N-diciclohexil-carbo-di-imida. P.f. 128-131°C.

30

Análisis para $C_{28}H_{24}NO_4Cl_3S$:

Calculado: C, 58,29; H, 4,19; N, 2,43; O, 11,09;

Cl, 18,44; S, 5,56.

4049-763



1

Análisis elemental para $C_{19}H_{20}N_2O_6$:

Calculado: C, 61,28; H, 5,41; N, 7,52; O, 25,78

Encontrado: C, 61,07; H, 5,68; N, 7,79; O, 25,50.

Preparación de péptidos de Fórmula III

5

Los siguientes ejemplos son ilustrativos del método de la síntesis de péptidos de esta invención.

EJEMPLO 28

Ester metílico de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-triptofil-L-leucina

10

Se suspenden 37,18 g (75 milimoles) de sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-triptófano en 150 ml de acetato de etilo y la suspensión se sacude dos veces con 100 ml cada vez de una solución de ácido cítrico al 10 % y de una solución de cloruro sódico al 10 %. La solución lavada se seca después sobre sulfato sódico y la solución seca se evapora a vacío para obtener un aceite. El aceite se disuelve en 50 ml de dimetilformamida y la solución se enfría a $-15^{\circ}C$. La solución fría se agrega a una solución previamente preparada de 9,10 g (50 milimoles) de hidrocloreuro de éster metílico de L-leucina y

15

20

25

30

5,5 ml (50 milimoles) de N-metilmorfolina en 50 ml de dimetilformamida a $-15^{\circ}C$. La mezcla se agita durante la noche a $-13^{\circ}C$ y se trata con una solución de 2,1 g (25 milimoles) de bicarbonato sódico en agua. Después de varias horas, la solución se vierte sobre 1,5 litros de una solución fría de cloruro sódico mientras se agita. La goma resultante se extrae con 500 ml de acetato de etilo y el extracto se lava dos veces con 200 ml de una solución 1 N de bicarbonato sódico, y después tres veces con 200 ml de agua y a continuación se seca sobre sulfato sódico. El extracto seco se

40⁴⁶⁴1763



1 evapora a vacío y el residuo se cristaliza en éter/éter de
petróleo para dar 14,11 g de producto en forma de sólido
amorfo. Cromatografía en capa delgada, una mancha (cloro-
toluidina); R_f 0,81 [CHCl_3 :MeOH:HOAc (75:24:1)]; RMN
5 (CDCl_3): δ 0,84 (M, 7, γCH_3 y γCH Leu), 1,43 (M, 2, βCH_2
Leu), 4,52 (g, αCH Trp), 5,41 (M, αCH Leu), 6,13 (d, αNH
Trp), 8,30 (M, αNH Leu).

Análisis elemental para $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5$:

Calculado: C, 65,29; H, 7,08; N, 9,52; O, 18,12

10 Encontrado: C, 65,36; H, 7,20; N, 9,68; O, 18,03.

EJEMPLO 29

Dihidrocloruro de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-O-terc-
butil-L-seril-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-glutaminil- β -
t-butil-L-aspartato

15 Una suspensión de 2,53 g de sal de dicitclohexilamina
de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-O-t-butil-L-serina en
acetato de etilo se sacude con una solución al 10 % de ácido
cítrico y después con una solución al 10 % de sal. La solu-
ción lavada se seca sobre sulfato sódico y después se evapo-
20 ra a vacío hasta formar un aceite. El aceite se disuelve en
15 ml de dimetilformamida y la solución se enfría a -15°C .
A la solución fría se añaden 0,61 ml de N-metilmorfolina y
0,69 ml de cloroformiato de isobutilo y la solución se agita
durante 15 minutos a -15°C . La mezcla de reacción resultante
25 se vierte sobre una solución fría previamente preparada
(-15°C) de 3,05 g (3,5 milimoles) de dihidrocloruro de L-ar-
ginil-L-arginil-L-alanil-L-glutaminil- β -t-butil-L-aspartato
en 25 ml de dimetilformamida y 5 ml de ácido acético. La mez-
cla se agita a -15°C durante 4 horas y después se mantiene
30 a -15°C durante 66 horas. Se añaden 800 ml de éter frío, se

404763



1 filtra el producto y se lava sobre el filtro con éter y solu-
 5 ción saturada de cloruro sódico. El producto se disuelve en
 metanol y la solución se evapora a vacío hasta sequedad. El
 producto residual se seca por separación azeotrópica del
 10 agua con 20 ml de benceno adicional. Las trazas residuales
 de sal se separan disolviendo el producto seco en dimetil-
 formamida caliente y filtrando la solución caliente. Después
 la solución filtrada se evapora a vacío. El producto resi-
 dual se disuelve en metanol y se obtiene en forma de preci-
 15 pitado cristalino por adición de éter. El producto se fil-
 tra y se seca a vacío para dar 2,57 g (71,5 %). Cromatogra-
 fía en capa delgada (cloro-toluidina): R_f 0,39 [butanol:
 ácido acético:agua(100:10:31)]; RMN (DMSO): δ 4,11 (s, 9
 éter O-t-butílico), 1,37 (s, 9 éster O-t-butílico), 1,60
 20 (s, $C=C(CH_3)_2$), 3,41 (s, =C-H); análisis cuantitativo de
 aminoácidos por hidrólisis ácida: Asp (0,96), Ser (0,76),
 Glu (0,95), Ala (1,00), Arg (1,97).

Análisis elemental para $C_{41}H_{73}N_{13}O_{13}Cl_2$:

Calculado: C, 47,95; H, 7,16; N, 17,73; O, 20,25;
 25 Cl, 6,90.

Encontrado: C, 47,69; H, 7,36; N, 17,81; O, 20,50;
 Cl, 6,66.

EJEMPLO 30

Ester etílico de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-S-benzo- 25 hidril-L-cisteinilglicina

A una mezcla agitada de 2,88 g (5 milimoles) de éster
 2,4,5-triclorofenílico de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-
 S-benzohidril-L-cisteína y 0,7 g (5 milimoles) de éster etí-
 lico de glicina en 80 ml de cloruro de metileno, se añade,
 30 a lo largo de 1 hora, una solución de 0,7 ml (5 milimoles)

4048-763



1 de trietilamina en 20 ml de cloruro de metileno. Después de
agitar durante la noche a la temperatura ambiente, el disol-
vente se evapora a vacío hasta formar un residuo oleoso. El
aceite se disuelve en acetato de etilo y se filtra para se-
5 parar el hidrocloreuro de trietilamina. El filtrado en aceta-
to de etilo se evapora a vacío y el aceite resultante se
cristaliza en acetato de etilo/éter de petróleo y se seca a
vacío para dar 1,41 g (58,3 %) del producto, p.f. 98-100°C.
Cromatografía en capa delgada: una mancha (cloro-toluidina),
10 R_f 0,82 [CHCl_3 :MeOH:HOAc (75:24:1)].

Análisis elemental para $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$:

Calculado: C, 64,61; H, 6,27; N, 5,80; S, 6,64

Encontrado: C, 64,75; H, 6,43; N, 5,75; S, 6,78

EJEMPLO 31

15 N-(3-Metil-1-butin-3-oxicarbonil)-S-tritil-L-cisteinilglici-
nato de etilo

A 4,99 g (1,63 milimoles) de sal de dicitclohexilamina
de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-S-tritil-L-cisteína
y 1,07 g (7,73 milimoles) de hidrocloreuro de éster etílico
de glicina en 15 ml de cloruro de metileno a 0°C se añaden,
20 con agitación, 1,57 g (7,63 milimoles) de N,N-dicitclohexil-
carbo-di-imida. Se continúa agitando a 0°C y después se de-
ja que la mezcla de reacción se caliente hasta la temperatura
ambiente durante toda la noche. Se filtra la dicitclohexil-
urea y el filtrado se evapora a vacío hasta formar una espu-
25 ma. La espuma se disuelve en 30 ml de acetato de etilo y la
solución se lava con 10 ml cada vez de una solución 1 N de
bicarbonato sódico, salmuera, solución de ácido cítrico al
10 % y solución de sal al 10 %. La solución lavada se seca
30 sobre sulfato sódico, se filtra y evapora a vacío para dar



1 3,52 g (82,6 %) de una espuma esponjosa blanca que resiste a los intentos de cristalización.

5 RMN (CDCl₃): 1,25 (t, 3, J=7 Hz OCH₂CH₃), 1,66 (s, 6, C=C(CH₃)₂O), 2,49 (s, 1, H-C=C-), 2,67 (doblete o dobletes, 2, J = 6 y 7 Hz, -CH₂S-), 3,95 (d, 2, J = 7 Hz, OCONH-), 6,49 (m, 1, CONH-), 7,35 (M, 15δ).

Análisis elemental para C₃₂H₃₄N₂O₅S:

Calculado: C, 68,80; H, 6,14; N, 5,02; O, 14,31; S, 5,73.

10 Encontrado: C, 68,56; H, 6,42; N, 5,00; O, 14,28; S, 5,83.

EJEMPLO 32

N-(3-Metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanil-S-tritil-

L-cisteinilglicinato de etilo

15 A una mezcla de 1,24 g (2 milimoles) de sal tosilato de S-tritil-L-cisteinilglicinato de etilo y 0,912 g (2 milimoles) de sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanina en 10 ml de cloruro de metileno se añaden, con agitación, 0,412 g (2 milimoles) de N,N-dicitclohexil-carbo-di-imida a 0°C. Se continúa agitando a 0°C durante varias horas y después la mezcla de reacción se deja calentar a la temperatura ambiente durante la noche. Se filtra la mezcla y el filtrado se evapora a sequedad en vacío. El residuo se disuelve en 40 ml de acetato de etilo y la solución se filtra y se lava consecutivamente con bicarbonato sódico 1 N, cloruro sódico al 10 %, ácido cítrico al 10 % y cloruro sódico al 10 %. La solución lavada se seca sobre sulfato sódico, se filtra y después se evapora a sequedad en vacío. El residuo se cristaliza en acetato de etilo/éter de petróleo para dar 0,74 g (52,4 %) de producto,

30

401763



1 que funde alrededor de 181°C con descomposición.

Análisis elemental para $C_{41}H_{43}N_3O_6S$:

Calculado: C, 69,77; H, 6,14; N, 5,95; O, 13,60;
S, 4,54

5 Encontrado: C, 69,51; H, 6,27; N, 6,04; O, 13,71;
S, 4,67.

EJEMPLO 33

Amida de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-triptofil-L-
L-metionil-L-aspartil-L-fenilalanina

10 Se agita a $-15^{\circ}C$ durante 8 horas y a la temperatura ambiente durante 60 horas una mezcla de 1,165 g (2,56 milimoles) de éster 2,4,5-triclorofenílico de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-triptófano, 1,0 g (2,33 milimoles) de monohidrato de amida de L-metionil-L-aspartil-L-fenilalanina
15 y 0,26 ml (2,33 milimoles) de trietilamina en 15 ml de dimetilformamida. Durante este periodo se produce la disolución. La solución reaccionante se vierte sobre 50 ml de agua de hielo y la solución acuosa fría se acidula a pH 3 con una solución acuosa saturada de ácido cítrico. El producto de reacción en forma de precipitado se filtra y se
20 lava con agua. Después el producto se hierve en 50 ml de etanol absoluto para separar el agua y el 2,4,5-triclorofenol. El producto de reacción se separa por filtración del etanol enfriado y se seca a vacío sobre lentejas de hidróxido potásico para dar 1,09 g (66 %) de un producto que funde
25 de alrededor de 209-210°C con descomposición.

La cromatografía en capa delgada del producto presenta una mancha (ninhidrina y cloro-toluidina); R_f 0,79 con tetrahidrofurano: $C_6H_{12}:H_2O$, 94:7:5.

30 Análisis elemental para $C_{35}H_{42}N_6O_8S$:

43⁵²1763



1 de reacción se agita a 0°C durante 9 horas y después a la
temperatura ambiente durante 10 horas. A continuación la
mezcla de reacción se vierte sobre una mezcla de 115 ml de
5 agua de hielo, 0,45 ml de ácido acético y 39 ml de ciclo-
hexano. La goma sólida se filtra, se lava con agua y des-
pués se calienta en 39 ml de etanol a una temperatura com-
prendida entre 50° y 60°C. El producto de reacción se fil-
tra, se lava con agua y se seca a vacío sobre lentejas de
10 hidróxido potásico para dar 2,47 g (61,2 %) del producto
que funde a unos 203-204°C con descomposición.

Cromatograma en capa delgada: una mancha (cloro-tolui-
dina); R_f 0,56 con CHCl₃:MeOH:HOAc, 75:24:1.

Análisis elemental para C₂₄H₃₂N₄O₇S: -

Calculado: C, 55,37; H, 6,20; N, 10,76; S, 6,16

15 Encontrado: C, 55,64; H, 6,39; N, 10,71; S, 6,37.

EJEMPLO 35

Monohidrato de amida de L-metionil-L-aspartil-L-fenilala-
nina

20 Se hidrogenan durante 2,5 horas, sobre 0,454 g de
paladio al 5 % en carbón activo, 2,36 g (4,53 milimoles)
de amida de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionil-
L-aspartil-L-fenilalanina en 200 ml de ácido acético al
80 %. Se filtra el catalizador y el filtrado se evapora a
vacío hasta formar un aceite. El aceite residual se destila
25 azeotrópicamente a vacío con tres porciones de 50 ml de
benceno y el sólido resultante se hierve en 50 ml de meta-
nol, se filtra y se seca a vacío sobre hidróxido potásico
para dar 1,16 g (62,4 %) de producto, p.f. 211-214°C.

Análisis elemental para C₁₈H₂₆N₄O₅S.H₂O:

Calculado: C, 50,45; H, 6,59; N, 13,08; S, 7,48

30 Encontrado: C, 50,63; H, 6,86; N, 12,92; S, 7,39.



401763

EJEMPLO 36

N-(3-Metil-1-pentin-3-oxicarbonil)-L-metionil-L-asparagui-
nil-di-O-t-butil-L-treoninato

Una solución de 2,27 g (5 milimoles) de sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-pentin-3-oxicarbonil)-L-metionina en 30 ml de dimetilformamida se enfría a -15°C y se trata con 0,625 ml de cloruro de pivaloilo. La mezcla se agita a -15°C durante 15 minutos y después se trata con una solución previamente enfriada (-15°C) de 1,55 g (4,5 milimoles) de L-asparaguinil-di-O-t-butil-treoninato en 15 ml de dimetilformamida. La mezcla se agita a 0°C durante 2,5 horas y después se trata con 15 ml de una solución 1 N de bicarbonato sódico. Después de agitar durante 5 minutos, la solución fría se vierte sobre 145 ml de una solución al 90% de cloruro sódico al 90% de saturación y se agita durante 15 minutos. El precipitado resultante se filtra y se lava con agua y una solución saturada de bicarbonato sódico. El producto se disuelve en 100 ml de acetato de etilo y se filtra para separar el hidrocioruro de dicitclohexilamina. El filtrado se lava dos veces con 30 ml cada vez de una solución de ácido cítrico al 10% y tres veces con 50 ml cada vez de agua y después se seca sobre sulfato sódico. El filtrado seco se evapora a vacío para dar 1,65 g de una espuma sólida.

Cromatografía en capa delgada: una mancha (clorotoluidina); R_f 0,44 [$CHCl_3$:MeOH:HOAc (75:24:1)].

Análisis elemental para $C_{28}H_{48}N_4O_8S$:

Calculado: C, 55,98; H, 8,05; N, 9,33; O, 21,30;
S, 5,34

Encontrado: C, 56,20; H, 8,22; N, 9,08; O, 21,01;
S, 5,54.

401763



EJEMPLO 37

Preparación de la secuencia de aminoácidos 22-26 del glucagon

1
5
10
15
20
A una solución de 14,68 g (21,2 milimoles) de éster metílico de N-carbobenzoxi-L-valil-L-glutaminil-L-triptofil-L-leucina en 600 ml de dioxano acuoso al 50 % se añaden 21,2 ml (42,4 milimoles) de hidróxido sódico 2 N y la solución se agita durante 17 horas para efectuar la saponificación del éster metílico. La mezcla de reacción se acidula a pH 5,3 por adición de 21,2 ml de ácido clorhídrico 1 N. Después el pH de la mezcla se ajusta a 3,5 con solución de ácido cítrico al 10 %. La mezcla de reacción se diluye con 100 ml de agua agitando y la mezcla diluida se mantiene durante varias horas a 4°C. El producto de reacción se filtra y se lava con agua y se seca sobre lentejas de hidróxido potásico. El cromatograma en capa delgada sobre placas de gel de sílice indica un material de una mancha (cloro-toluidina); R_f 0,56 con $CHCl_3$:n-butanol:ácido acético:agua (75:24:12:2). El espectro de resonancia magnética nuclear del producto indica la ausencia de resonancia de O-metilo a 3,6 ppm en DMSO.

25
30
El carbobenzoxi-tetrapéptido saponificado se disuelve en 300 ml de dimetilformamida y se hidrogena durante 5 horas sobre 2,0 g de paladio al 5 % en carbón, a la temperatura ambiente. Se filtra el catalizador y el filtrado se evapora a vacío para dar 8,66 g (75,2 %) L-valil-L-glutaminil-L-triptofil-L-leucina en forma de goma residual. La cromatografía en capa delgada sobre gel de sílice indica un material de una mancha con un R_f de 0,37 con el sistema disolvente éter:metanol:agua (75:24:1). El espectro RMN indica la ausencia de resonancia atribuible al grupo carbobenzoxi. El aná-

4054763



1 lisis cuantitativo de aminoácidos del hidrolizado ácido del tetrapéptido desbloqueado da el siguiente resultado: Glu (1,0), Leu (1,07), Val (0,96).

5 Se agita a 0°C durante 5 horas y después se deja calentar a la temperatura ambiente una mezcla de 6,93 g (12,73 milimoles) de L-valil-L-glutaminil-L-triptofil-L-leucina, obtenida en la forma antes descrita, y 5,39 g (14,01 milimoles) de éster de N-hidroxisuccinimida de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanina en 100 ml de dimetilformamida. Después la mezcla de reacción se agita durante 10 90 horas y a continuación se evapora a vacío hasta un volumen de unos 20 ml. Por adición de éter se obtienen 8,48 g (83 %) del producto de reacción, N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanil-L-valil-L-glutaminil-L-triptofil-L-leucina en forma de precipitado sólido que funde alrededor 15 de 170-175°C. El producto péptido es cristalizado en metanol-agua hirviendo y secado sobre lentejas de hidróxido potásico para dar 3,3 g (33 %) de un producto que funde a unos 207-209°C. La cromatografía en capa delgada revela una 20 mancha (cloro-toluidina), con un R_f de 0,44 con cloroformo: metanol:ácido acético (25:24:1) y un R_f de 0,186 con tetrahidrofurano:ciclohexano:agua (94:7:5). El espectro de resonancia magnética nuclear del producto en DMSO da los siguientes resultados: δ 0,84 (M, 14, CH_3 -valina y leucina, βCH -valina, γCH -leucina), δ 1,5 (S, $\beta\text{-CH}_2$ -leucina), δ 1,53 25 S, δ 3,33 (S, $\text{C}\equiv\text{C-H}$), δ 10,78 (S, NH del indol, -triptófano).

Análisis cuantitativo de aminoácidos del hidrolizado ácido: Glu (1,0), Leu (1,04), Val (0,97), Phe (0,96).

30 Análisis elemental para $\text{C}_{42}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_9$:



401763

Calculado: C, 62,91; H, 6,91; N, 12,23; O, 17,95

Encontrado: C, 62,72; H, 7,00; N, 12,23; O, 18,20

EJEMPLO 38

En 10 ml de dimetilformamida se disuelven 3,21 g (4 milimoles) del hidrocloreuro del péptido N-prottegido del Ejemplo 37 y la solución se agrega sobre otra solución fría (0°C) de 2,57 g (5 milimoles) de L-metionil-L-asparaguinil-di-O-t-butil-L-treoninato y 0,55 ml (5 milimoles) de N-metil-morfolina en 40 ml de dimetilformamida, con agitación. A la mezcla de reacción agitada, mantenida a una temperatura de unos 0°C, se añade una solución de 0,69 g (6 milimoles) de N-hidroxisuccinimida en 5 ml de dimetilformamida y una solución de 0,824 g (4 milimoles) de dicitclohexilcarbo-di-imida en 5 ml de dimetilformamida. La mezcla de reacción se agita a 0°C durante 2 horas y a la temperatura ambiente durante 64 horas. Después la mezcla se enfría a 0°C durante varias horas y el precipitado del dicitclohexilurea se filtra. El filtrado se evapora a vacío hasta pequeño volumen y se diluye con acetato de etilo. La mezcla de reacción diluida se mantiene después a 4°C durante varias horas y el producto precipitado se filtra. El producto se lava sucesivamente con éter y agua y después se seca sobre lentejas de hidróxido potásico para dar 4,38 g de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanil-L-valil-L-glutaminil-L-triptofil-L-leucil-L-metionil-L-asparaguinil-di-O-t-butil-L-treoninato (87 %), que funde alrededor de 221-225°C (desc.). El cromatograma en capa delgada sobre gel de sílice indica un material de una mancha (cloro-toluidina) con un R_F de 0,88 con cloroformo: metanol:ácido acético (75:24:1). El análisis cuantitativo de aminoácidos del hidrolizado ácido del producto da los

401763



1

siguientes resultados: Asp (1,0), Thr (0,95), Glu (0,99), Val (0,99), Met (0,97), Leu (1,03) y Phe (0,99).

Análisis elemental para $C_{63}H_{93}N_{11}O_{14}S$:

Calculado: C, 60,03; H, 7,44; N, 12,22; O, 17,77;
S, 2,54

5

Encontrado: C, 59,87; H, 7,26; N, 12,25; O, 18,04;
S, 2,44.

EJEMPLO 39

10

El producto de reacción anterior del Ejemplo 38 (MBOC-L-Phen-L-Val-L-Glu-L-Trp-L-Leu-L-Met-L-Asp-di-O-t-butyl-L-Thr) se disuelve en 75 ml de dimetilformamida y se hidrogena a la temperatura ambiente en presencia de 1,19 g de paladio al 5 % en carbón. La hidrogenolisis va seguida de recogida del dióxido de carbono desprendido en un separador de hidróxido bórico. La hidrogenolisis parece completa al cabo de 1,5 horas pero se deja continuar durante 3 horas. Se filtra el catalizador y el filtrado se decolora con carbón. La mezcla de reducción clarificada se evapora a vacío hasta formar un residuo. El residuo se disuelve en dimetilformamida y el producto se precipita agregando agua a la solución gota a gota. Se filtra el producto y se lava con agua y se seca a vacío durante la noche para dar 1,77 g (64,7 %) de producto que funde a unos 239-240,5°C (desc.). El cromatograma en capa delgada sobre gel de sílice muestra el producto como una sola mancha con un R_f de 0,29 con cloroformo:metanol:ácido acético (75:24:1). El análisis cuantitativo de los aminoácidos del hidrolizado ácido del producto, L-Phe-L-Val-Glu-L-Trp-L-Leu-L-Met-L-Asp-di-O-t-butyl-L-Thr, da el siguiente resultado: Asp (1,13), Thr (1,08), Glu (1,0), Val (0,98), Met (1,13), Leu (1,05), Phe (1,16),

15

20

25

30

-58 -
40.1763



1 Trp (097).

Análisis elemental para $C_{57}H_{87}N_{11}O_{12}S$:

Calculado: C, 59,51; H, 7,62; N, 13,39; O, 16,69;
S, 2,79

5

Encontrado: C, 59,62; H, 7,85; N, 13,15; O, 16,70;
S, 3,00.

EJEMPLO 40

Preparación de la secuencia de aminoácidos 27-29 del glucagon

10

Método A

N-(3-Metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionil-L-asparaguinil-
di-O-terc-butil-L-treoninato

15

Se suspenden 8,8 g (0,02 moles) de sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionina en 50 ml de acetato de etilo y la suspensión se sacude una vez con 40 ml de solución al 10 % de ácido cítrico, dos veces con 40 ml cada vez de solución al 10 % de cloruro sódico y después se seca sobre sulfato sódico anhidro. El acetato de etilo se evapora a vacío y el aceite residual se disuelve en 40 ml de tetrahidrofurano. Se añaden 6,90 g (0,02 moles) de L-asparaguinil-di-O-terc-butil-L-treoninato, seguido de 4,99 g (0,022 moles) de N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína (EEDQ) y la mezcla de reacción se agita durante la noche a la temperatura ambiente. La solución se evapora a vacío hasta formar un aceite y el aceite se disuelve en 50 ml de acetato de etilo. La solución se lava tres veces con 50 ml cada vez de una solución al 10 % de ácido cítrico y una solución al 10 % de cloruro sódico y se seca sobre sulfato sódico anhidro. Se evapora el acetato de etilo a vacío para formar una espuma blanca. La espuma

25

30

459-1763



1 se disuelve en la cantidad mínima de éter y se añade ciclo-
hexano suficiente para precipitar el producto en forma de
polvo fino. Se filtra el precipitado y el filtrado se eva-
pura a vacío. El producto amorfo resultante se recoge para
5 dar 8,3 g (71 %) del compuesto deseado. Cromatografía en
capa delgada: una mancha (ninhidrina y cloro-toluidina);
 R_f 0,76 [butanol:ácido acético:agua (100:10:30)].

Análisis elemental para $C_{27}H_{46}N_4O_8S$:

Calculado: C, 55,27; H, 7,91; N, 9,55; O, 21,81;
10 S, 5,46

Encontrado: C, 55,31; H, 8,19; N, 9,36; O, 21,89;
S, 5,73.

L-Metionil-L-asparaguinil-di-O-terc-butil-L-treoninato

15 Se disuelven 1,174 g (2 milimoles) de N-(3-metil-1-
butin-3-oxycarbonil)-L-metionil-L-asparaguinil-di-O-terc-
butil-L-treoninato en 50 ml de metanol. A la solución se
añade una pequeña cantidad de paladio al 5 % en carbón, hu-
medecido con agua, y se hace pasar hidrógeno a través de la
solución agitada durante 2,75 horas. Se filtra el cataliza-
20 dor y el filtrado se evapora a vacío hasta formar un aceite.
El aceite se tritura sucesivamente con pentano y éter. Por
evaporación de los disolventes a vacío se obtiene una espu-
ma sólida blanca, 0,585 g (61,4 %). Cromatografía en capa
delgada: una mancha (ninhidrina y cloro-toluidina); R_f
25 0,56 con 2-butanol: NH_3 al 3 % (3:1).

Análisis elemental para $C_{21}H_{40}N_4O_6S$:

Calculado: C, 52,92; H, 8,46; N, 11,75; S, 6,73

Encontrado: C, 52,49; H, 8,55; N, 10,19; S, 6,34.

30 Por concentración de los triturados se obtienen 0,192 g
adicionales del producto (20 %) contaminados con una peque-

4964-763



1 ña cantidad del material de partida como se determina por cromatografía en capa delgada.

Método B

N-(3-Metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionil-L-asparaguinil-

di-O-terc-butil-L-treoninato

5 Una suspensión de 4,41 g (10 milimoles) de sal de dicitclohexilamina de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionina en 75 ml de acetato de etilo se lava dos veces con 20 ml cada vez de una solución al 10 % de ácido cítrico y dos veces con 20 ml de agua cada vez y después se seca sobre sulfato sódico anhidro. La solución seca se evapora hasta dar un aceite residual. El aceite se disuelve en 20 ml de dimetilformamida y la solución se enfría a -15°C . A la solución se añaden 1,1 ml (10 milimoles) de N-metilmorfolina y 1,23 ml (9,5 milimoles) de cloroformiato de isobutilo. La mezcla se agita a -15°C durante 15 minutos y después se trata con una solución previamente preparada de 2,59 g (7,5 milimoles) de L-asparaguinil-di-O-terc-butil-L-treoninato en 90 ml de dimetilformamida previamente enfriada a -15°C . La mezcla se agita a -15°C durante 15 horas y después se trata con una solución fría de 0,21 g de bicarbonato sódico en 20 ml de agua y se agita durante 30 minutos más a -15°C . La solución se vierte sobre 800 ml de solución saturada de cloruro sódico con intensa agitación. La goma producida se recoge, se disuelve en acetato de etilo, se lava con agua y se seca sobre sulfato sódico anhidro. La solución seca se evapora a vacío para dar un aceite transparente que se cristaliza en éter/éter de petróleo ($30-60^{\circ}$). El producto cristalino se filtra y se seca a vacío sobre hidróxido potásico para dar 2,58 g (58,7 %) del compuesto deseado.

10

15

20

25

30

- 61 -
4) 1763



1 Cromatografía en capa delgada: una mancha (cloro-toluidina);
R_f 0,66 con 2-butanol/hidróxido amónico al 3 % (3:1).

5 RMN (DMSO): 1,05 (d,3,J = 6 Hz, βCH₃ Thr), 1,14
(S,9, éter O-t-butílico), 1,41 (S, éter O-t-butílico),
1,61 (S,6 C-C(CH₃)₂), 2,04 (S,3,SCH₃Met), 3,37 (S,1,H-C≡C),
4,08 (M,3,βCH Thr, αCH Thr, αCH Met), 4,71 (M, 1,5 6 y 8 H₂,
αCH Asn), 6,94 y 7,37 (S,1 CONH₂ Asn), 7,25 (d,1,J = 8 Hz,
NH Met), 7,52 (d,1, J = 8, NH Asn), 8,25 (d,1, J = 8, NH
Thr).

10 Análisis elemental calculado para C₂₇H₄₆N₄O₈S:
Calculado: C, 55,27; H, 7,91; N, 9,55; O, 21,81;
S, 5,46
Encontrado: C, 55,33; H, 8,15; N, 9,27; O, 22,01;
S, 5,24

15 EJEMPLO 41

N-(1-Etinilciclohexil-1-oxicarbonil)-L-metionil-L-asparagui-
nil-di-O-t-butil-L-treoninato

20 Se prepara por el anterior procedimiento B descrito
en el Ejemplo 40, haciendo reaccionar N-(1-etinilciclohexil-
oxicarbonil)-L-metionina (aislada de la sal de diciohexil-
amina) con L-asparaguinil-di-O-t-butil-L-treoninato.

25 Análisis elemental para C₃₀H₅₀N₄O₈S:
Calculado: C, 57,48; H, 8,04; N, 8,94; O, 20,42;
S, 5,11
Encontrado: C, 57,20; H, 7,84; N, 8,74; O, 20,67;
S, 5,35.

EJEMPLO 42

N-(1-Fenil-3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionil-L-aspa-
raguinil-di-O-terc-butil-L-treoninato

30 Se prepara por el procedimiento A descrito en el Ejem-



1 plo 40, haciendo reaccionar 1-fenil-3-metilbutinil-3-oxicar-
bonil-L-metionina (aislada de su sal de dicitclohexilamina)
con L-asparaguinil-di-O-terc-butit-L-treoninato.

Punto de fusión, 72,5-75°C.

5 Análisis elemental para $C_{33}H_{50}N_4O_8S$:

Calculado: C, 59,80; H, 7,60; N, 8,45; S, 4,84

Encontrado: C, 59,55; H, 7,81; N, 8,36; S, 4,89.

10 La hidrogenolisis de los tripéptidos protegidos antes
descritos de los Ejemplos 41 y 42 por el procedimiento des-
crito en el Método A proporciona el tripéptido L-metionil-
L-asparaguinil-di-O-t-butit-L-treoninato, que es el fragmen-
to aminoácido 27-29 del glucagon.

EJEMPLO 43

15 Hidrocloruro de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-O-t-butit-
L-serit-L-arginit-L-arginit-L-alanit-L-glutaminil-L-t-butit-
L-aspartit-L-fenilalanit-L-valit-L-glutaminil-L-triptofit-
L-leucit-L-metionit-L-asparaguinil-di-O-t-butit-L-treoninato

20 A una solución de 1,438 g (1,25 milimoles) de L-fenil-
alanit-L-valit-L-glutaminil-L-triptofit-L-leucit-L-metionit-
L-asparaguinil-di-O-t-butit-L-treoninato en 15 ml de dime-
tilformamida, mantenida a una temperatura de -15°C, se añade
una solución de 1,921 g (1,87 milimoles) de dihidrocloruro
de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-O-t-butit-L-serit-L-
25 arginit-L-arginit-L-alanit-L-glutaminil-O-t-butit-L-aspar-
tato en 8 ml de dimetilformamida. A la mezcla de reacción
agitada se añaden 0,431 g (3,74 milimoles) de 1-hidroxisu-
ccinimida, 0,258 g (1,25 milimoles) de dicitclohexil-carbo-
di-imida y 7 ml de dimetilformamida. La mezcla de reacción
se agita durante 3 horas a -15°C, durante 90 horas a 4°C y
30 después a la temperatura ambiente durante 24 horas. Se fil-

4-63 1763



1 tra la mezcla de reacción y el filtrado se diluye con acetato de etilo, con formación de un precipitado. El precipitado se filtra y se cristaliza tres veces en metanol/acetato de etilo para dar 0,615 g (22 %) de N-(3-metil-1-butin-3-oxycarbonil)-O-t-butil-L-Ser-L-Arg-L-Arg-L-Ala-L-Glu-O-t-
5 butil-L-Asp-L-Phe-L-Val-L-Glu-L-Trp-L-Lew-L-Met-L-Asn-di-O-t-butil-L-Thr.2HCl.

El análisis cuantitativo de aminoácidos del hidrolizado ácido del producto de reacción da las siguientes proporciones relativas de aminoácidos:

10 Thr (0,98), Asp (2,2), Met (0,95), Lev (1,0), Glu (2,2), Val (0,98), Phe (0,93), Ala (1,2), Arg (2,2), Ser (1,00).

EJEMPLO 44

15 N-(1-Cloro-3-metil-1-butin-3-oxycarbonil)-L-metionil-L-asparaguinil-di-O-t-butil-L-treoninato

Una suspensión de 1,8 g (4 milimoles) de sal de diciclohexilamina de N-(1-cloro-3-metil-1-butin-3-oxycarbonil)-L-metionina en 10 ml de acetato de etilo se agita dos veces con 10 ml de una solución al 10 % de ácido cítrico y una
20 vez con una solución al 10 % de sal. La solución obtenida se seca sobre sulfato sódico y después la solución seca se evapora a vacío hasta dar un aceite residual. El aceite se disuelve en 10 ml de tetrahidrofurano y se añaden a la solución 1,38 g (4 milimoles) de N-asparaguinil-di-O-t-butil-L-treoninato y 0,998 g (4,4 milimoles) de N-etoxi-3-etoxi-1,2-dehidroquinoleína (EEDQ). La mezcla de reacción se agita durante la noche y después se evapora a sequedad en vacío hasta una espuma residual. El residuo se disuelve en
25 20 ml de acetato de etilo y la solución se lava tres veces
30

4-641763

17 AGO.



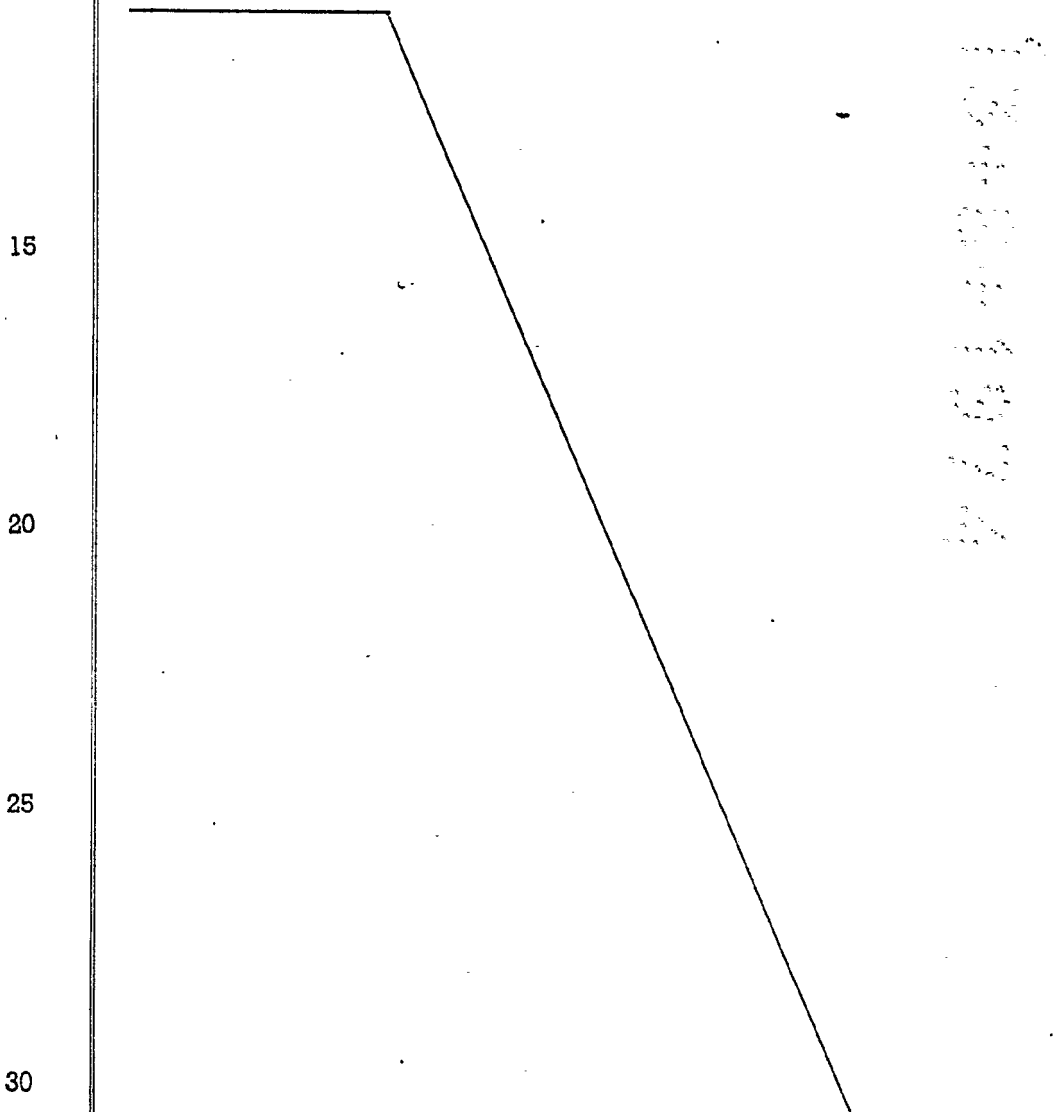
1 con 20 ml cada vez de una solución al 10 % de ácido cítrico
y una solución al 10 % de sal. La solución lavada se seca
y evapora para dar 1,09 g (44 %) del tripéptido N-protégido.

Análisis elemental para $C_{27}H_{46}O_8SCl$:

5 Calculado: C, 52,12; H, 7,45; N, 9,00; O, 20,57;
S, 5,15; Cl, 5,70

Encontrado: C, 52,24; H, 7,39; N, 8,75; O, 20,42;
S, 4,90; Cl, 5,68.

10 En resumen, la Patente de Invención que se solicita
deberá recaer sobre las siguientes:



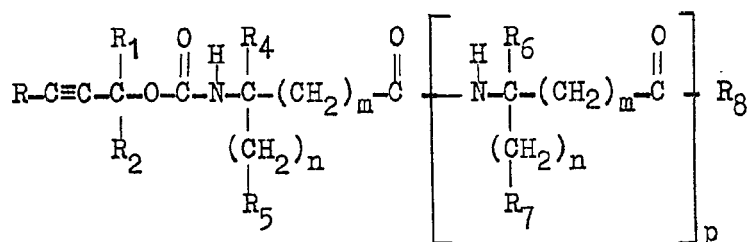


1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un compuesto de aminoácido N-prottegido con un grupo alquinilcarbinil-oxicarbonilo de fórmula:

5



10

III

donde

15

R es hidrógeno, cloro, fenilo o fenilo sustituido con alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₄ o halógeno;

R₁ tomado independientemente es hidrógeno o alquilo C₁-C₄;

R₂ tomado independientemente es alquilo C₁-C₄ y R₁ y R₂ unidos con el átomo de carbono al que están enlazados forman un anillo carbocíclico de 5, 6 ó 7 miembros;

20

R₄ y R₆ son independientemente hidrógeno o alquilo inferior;

25

R₅ y R₇ son independientemente hidrógeno, alquilo inferior, hidroxialquilo inferior, hidroxialquilo inferior protegido, aminoalquilo inferior, aminoalquilo inferior protegido, mercaptoalquilo inferior, mercaptoalquilo inferior protegido, alquil(inferior)mercapto alquilo inferior, carboxialquilo inferior, carboxialquilo inferior protegido, guanidinoalquilo inferior, guanidinoalquilo inferior protegido, guanidinooxialquilo inferior, imidazolilmetilo, imidazolil-

30



1
5
10
15
20
25
30

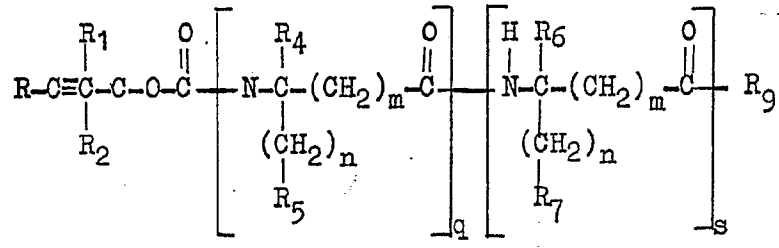
metilo protegido, indolilmetilo, indolilmetilo protegido, fenilo, 4-hidroxifenilo, o 4-hidroxifenilo protegido;

R₈ es hidroxilo, metoxi, etoxi, t-butoxi, 2,2,2-tricloroetoxi, fenoxi; N-oxisuccinimida, benciloxi, 4-nitrobenciloxi, 2,4,5-triclorofenoxi, pentaclorofenoxi o pentafluorfenoxi y las sales de adición de ácidos, de metales alcalinos, de metales alcalino-térreos, aminas, dietilamina, trietilamina, 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octano, dicitclohexilamina y dibencilamina de los mismos;

m y n son independientemente 0 o un número entero de 1 a 4;

p es 0 o un número entero de 1 a 14.

con la condición de que cuando p es 1 o mayor, entonces los significados de R₆, R₇, m y n entre los restos de aminoácido individuales que constituyen la cadena pueden ser iguales o diferentes; cuyo procedimiento se caracteriza por hacer reaccionar un compuesto alquililcarbiniloxycarbonílico de fórmula general IV

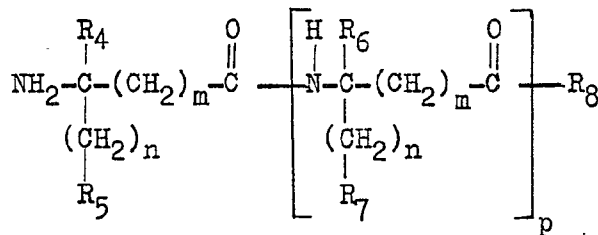


donde R₉ es flúor, cloro, fenoxi, p-nitrofenoxi, 2,4,5-triclorofenoxi, pentaclorofenoxi, pentafluorfenoxi, N-oxisuccinimida, sal de adición con ácido o sal de amina; q y s son independientemente 0 a 13, siendo la suma de q y s no mayor de 13; R, R₁, R₂, R₄, R₅, R₆ y R₇ son los definidos anterior-

40 1763



1 mente; con un compuesto aminoácido de fórmula V:



5

donde R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, n, m y p son los definidos anteriormente y, opcionalmente, cuando R₈ es hidroxil formar la sal de amina deseada o éster antes definido; hacer reaccionar el compuesto aminoácido N-prottegido obtenido con un aminoácido o péptido para formar el péptido N-prottegido deseado y separar el grupo N-prottegor del péptido por reacción del péptido N-prottegido con hidrógeno en presencia de un catalizador de hidrogenación, para proporcionar el nuevo péptido formado.

10

15

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por la etapa que comprende la hidrogenólisis catalítica de un péptido N-prottegido en presencia de un catalizador de paladio.

20

3. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho compuesto alquilcarbiniloxiacarbonílico es una sal o éster de N-(3-metil-1-butin-3-oxiacarbonil)-L-triptófano y dicho compuesto aminoácido es el éster metílico de L-leucina.

25

4. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado por hacer reaccionar una sal o éster de N-(3-metil-1-butin-3-oxiacarbonil)-S-benzohidril-L-cisteína con el éster etílico de glicina.

30

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado por hacer reaccionar una sal o éster de N-(3-

-40 1763 89



1 metil-1-butin-3-oxicarbonil)-S-tritil-L-cisteína con éster
etélico de glicina.

5 6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, ca-
racterizado por hacer reaccionar una sal o éster de N-(3-
metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanina con una sal de
S-tritil-L-cisteinilglicinato de etilo.

10 7. Un procedimiento según la reivindicación 1, carac-
terizado por hacer reaccionar una sal o éster de N-(1-fenil-
3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-metionina con L-asparagui-
nil-di-O-t-butil-L-treoninato.

8. Un procedimiento según la Reivindicación 1, ca-
racterizado por hacer reaccionar un éster o sal de N-(3-
metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenilalanina con L-valil-L-
glutaminil-L-triptofil-L-leucina.

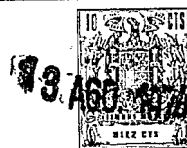
15 9. Un procedimiento según la Reivindicación 1, ca-
racterizado por hacer reaccionar una sal o éster de N-(3-
metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-triptófano con amida de L-me-
tionil-L-aspartil-L-fenilalanina.

20 10. Un procedimiento según la Reivindicación 1, carac-
terizado por hacer reaccionar una sal o éster de N-(3-metil-
1-butin-3-oxicarbonil)-O-t-butil-L-serina con dihidrocloru-
ro de ácido L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-glutaminil-β-t-
butil-L-aspártico.

25 11. Un procedimiento según la Reivindicación 1, ca-
racterizado por hacer reaccionar una sal o éster de N-(3-
metil-1-butin-3-oxicarbonil)-S-bencil-L-cisteinil-O-t-butil-
L-serina con L-asparaguinil-L-leucil-O-t-butil-L-serinil-L-
treoninato.

30 12. Un procedimiento según la Reivindicación 1, ca-
racterizado por hacer reaccionar una sal o éster de N-(3-

69
401763



1 metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-fenil-alanil-L-valil-L-glutami-
nil-L-triptofil-L-leucina con L-metionil-L-asparaguinil-di-
O-t-butil-L-treoninato.

5 13. Un procedimiento según la Reivindicación 1, ca-
racterizado por hacer reaccionar un dihidrocloruro de una
sal o éster de N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-O-t-butil-
L-seril-L-arginil-L-arginil-L-glutaminil-L-t-butil-L-aspar-
til-L-fenil-alanil-L-valil-L-glutaminil-L-triptofil-L-leucina
con L-metionil-L-asparaguinil-di-O-t-butil-L-treoninato.

10 14. Un procedimiento según la reivindicación 1, en
el que dicho derivado aminoácido N protegido obtenido es áci-
do N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-O-t-butil-L-tirosil-O-
t-butil-L-seril-L-E-t-butil oxicarbamil-L-lisil-O-t-butil-
L-tirosil-L-leucil-β-O-t-butil L-aspartico.

15 15. Un procedimiento según la reivindicación 1, en
el cual dicho derivado aminoácido N protegido es una amida
de un ácido N-(3-metil-1-butin-3-oxicarbonil)-L-histidil-L-
seril-L-asparaguinil-glicil-L-treonil-L-fenilalanil-L-treo-
nil-L-seril-L-glutamil-L-leucil-L-seril-L-arginil-L-leucil-
20 L-arginil-L-aspartico.

25 16. Un procedimiento según la Reivindicación 1, ca-
racterizado por hacer reaccionar cloruro o fluoruro de
3-metil-1-butin-3-oxicarbonilo o un éster del mismo con
L-metionina, L-fenilalanina, D-α-fenilglicina, S-tritil-
L-cisteína, O-t-butil-L-serina u O-t-butil-L-treonina.

30 17. Un procedimiento según la Reivindicación 1, para
la preparación de éster 2,4,5-triclorofenílico, caracte-
rizado por hacer reaccionar 2,4,5-triclorofenilcarbonato de
3-metil-1-butin-3-ilo con L-metionina, S-bencil-L-cisteína
o S-benzohidril-L-cisteína.

40 1763



1

18.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN COMPUESTO DE AMINOACIDO N-PROTEGIDO.

5

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente memoria descriptiva que consta de setenta páginas mecanografiadas .

10

Madrid, 14 de abril 1972

BERNARDO UNGRIA

P.P.

15

20

25

30