

403973



RAN 4105/5

Int. Cl.:	C07C//A61K

P A T E N T E
 D E
 I N V E N C I O N

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NONAPEPTIDOS",
 a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.
 residente en BASILEA (Suiza)

= . =

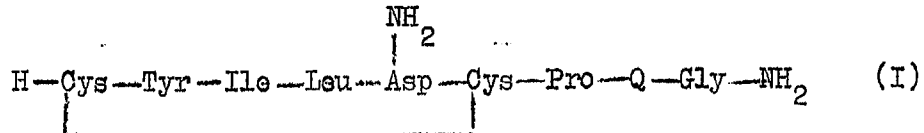
MEMORIA DESCRIPTIVA

ANULADO
PROHIBIDA LA CONCESION DE PATENTES PARA LAS ACTIVIDADES DE INVESTIGACIONES

Este invento se refiere a nonapeptidos y a un
 procedimiento para prepararlos.

Los nonapeptidos proporcionados por este invento
 son compuestos de la fórmula general

5.

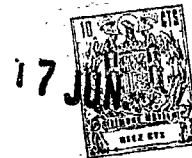


en la que

Q representa el radical de la arginina o de la
 lisina y

10.

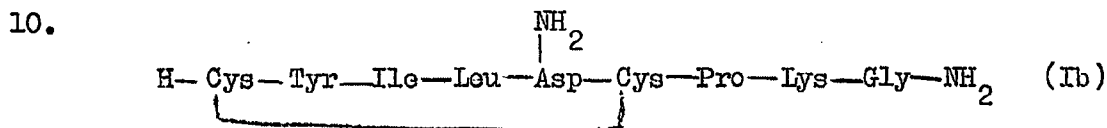
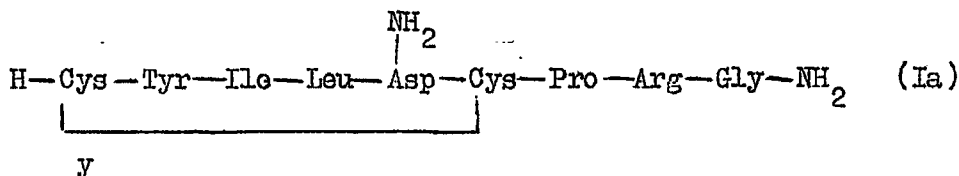
todos los aminoácidos que contienen un átomo



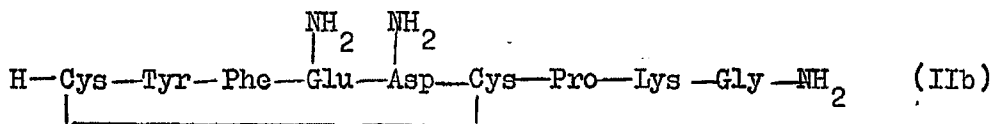
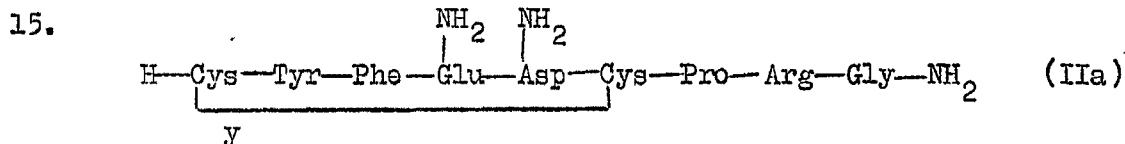
de carbono asimétrico presentan la configuración L,

y sus sales de adición de ácido atóxicas y utilizables farmacéuticamente.

5. Los compuestos de la fórmula I, que pueden representarse también por las fórmulas



son análogos de las hormonas neurohipofisarias que aparecen en la naturaleza; por ejemplo, de la arginino- o lisino-vasopresina de las fórmulas



20. En contraste con las vasopresinas que aparecen en la naturaleza, los compuestos proporcionados por este invento se caracterizan por el reemplazo de los aminoácidos fenilalanina y glutamina por la isoleucina y la leucina. En consecuencia, se los puede designar como [ile³, leu⁴]-arginino-vasopresina e [ile³, leu⁴]-lisino-vasopresina, respectivamente.
- 25.

Las abreviaturas utilizadas en esta descripción

7 JUN



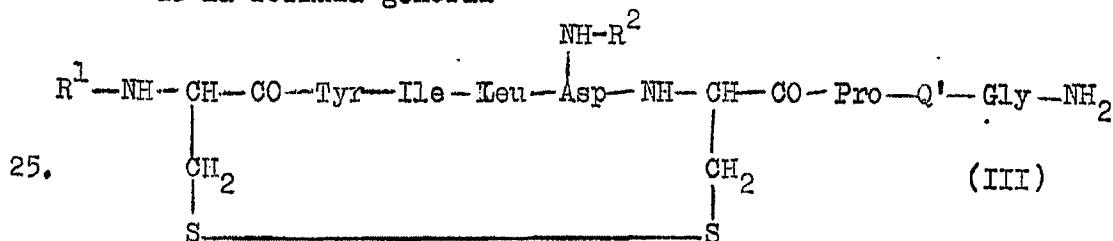
5. para los aminoácidos individuales y sus grupos protectores son las corrientes en la química de los péptidos y conocidas generalmente en la especialidad (véase Schröder, E., y Lübke, K.: The Peptides, Academic Press, Nueva York y Londres, vol. I (1965) y vol. II (1966) y las Normas IUPAC IUB). Por lo tanto, no se las define más detalladamente en esta descripción.

10. A menos que se haga constar expresamente otra cosa, los aminoácidos ópticamente activos tienen siempre la configuración L.

15. Ejemplos de sales de adición de ácido atóxicas y utilizables farmacéuticamente son las sales con ácidos inorgánicos, como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido fosfórico, el ácido sulfúrico y el ácido perclórico, o con ácidos orgánicos, como el ácido acético, el ácido oxálico, el ácido maleico, el ácido málico, el ácido tartárico y el ácido cítrico.

20. Según el procedimiento proporcionado por este invento, los nonapéptidos en cuestión (o sea los compuestos de la fórmula I y sus sales de adición de ácido atóxicas y utilizables farmacéuticamente) se preparan:

a) escindiendo los grupos protectores de un péptido de la fórmula general



en la que

R^1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo

403973



donde

- R^3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector del radical guanidínico;
- R^4 representa un átomo de hidrógeno o un grupo amino-protector que protege el radical lisínico;
- 5.

y

- R^5 y R^6 representa cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo sulfidrilo-protector (con tal de que uno a lo menos de los símbolos R^1 , R^2 y R^3 o R^4 represente un grupo protector); además
10. de que todos los aminoácidos que contienen un átomo de carbono asimétrico presentan la configuración L,

- con escisión simultánea del grupo protector o los grupos protectores y, si se desea, convirtiendo el producto obtenido, por tratamiento con un ácido orgánico o inorgánico, en una sal de adición de ácido atóxica y utilizable farmacéuticamente.
- 15.

- La oxidación de un péptido de la fórmula IV o V puede efectuarse de manera conocida (véase, por ejemplo, Schröder-Lübke, vol. I página 275 y siguientes), preferentemente en solución acuosa o acuosoorgánica, mediante la introducción de aire u oxígeno o mediante peróxido de hidrógeno, yodo, 1,2-diyodoetano o ferricianuro potásico. Los
20. grupos sulfidrilo-protectores que pueden hallarse presentes pueden eliminarse antes de la oxidación o al mismo tiempo que se realiza ésta. Un péptido de la fórmula IV en el que
25. R^5 y R^6 sean iguales y representen cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo de tritilo, benzohidrilo, acetamidome-



- tilo, benciltiometilo o isobutiloximetilo pueden oxidarse, por ejemplo, con ditiocianógeno $[(SCN)_2]$; y un péptido de la fórmula IV en el que R^5 y R^6 sean iguales y representen cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo de tritilo o acetamidometilo puede oxidarse, por ejemplo, con yodo.
5. La escisión de los grupos protectores de un péptido de la fórmula III o V puede efectuarse igualmente de manera generalmente conocida y en las condiciones aplicables a los grupos individuales.
10. Pueden usarse en este procedimiento todo los grupos protectores que se conocen en relación con las síntesis de los péptidos.
- Ejemplos de grupos amino-protectores son los del tipo acílico (por ejemplo, formilo, benzoilo, ftalilo, trifluoroacetilo, p-tosilo, aril- y alquil-fosforilo, fenil- y bencil-sulfonilo, tritilsulfenilo, o-nitrofenilsulfenilo, gamma-clorobutirilo y o-nitrofenoxiacetilo), del tipo alquílico (por ejemplo, tritilo, bencilo y alquilideno) y del tipo uretánico (por ejemplo, carbobenzoxilo, p-bromo-, p-cloro- y p-metoxicarbobenzoxilo, toliloxi-, aliloxi-, ciclo-pentiloxi-, ciclohexiloxi-, terci-butiloxi- o 1,1-dimetilpropiloxi-, 2-(p-bifenilil)-2-propiloxi-carbonilo y benciltio-carbonilo). Los grupos amínicos pueden protegerse además por protonación. Ejemplos de grupo amido-protectores son xantenilo, 2,4-dimetoxibencilo, 2,4,6-trimetoxibencilo y 4,4'-dimetoxibenzohidrilo.
- 15.
- 20.
- 25.

Como grupos protectores particulares para el radical arginínico cabe citar, por ejemplo, p-tosilo, carbobenzoxilo, p-nitrocarbobenzoxilo, terci-butoxi-, adamantilo-



17 JUN 1977

xi- e isoborniloxi-carbonilo. El radical arginílico puede protegerse también mediante protonación o nitración.

- Ejemplos de grupos sulfidrilo-protectores son los grupos de alquil- y aril-tio (por ejemplo, otilitio, 5. tercibutilitio y fonilitio), los grupos alquílicos y alquílicos substituídos (por ejemplo, tercibutilo, 2-dietoxi-carbonil-etilo, bencilo, tritilo, p-metoxibencilo, p-nitrobencilo, bonciltiometilo, acetamidometilo e isobutiloxi-metilo), los grupos acílicos (por ejemplo, carbobenzoxilo, 10. benzoílo, acetilo, p-metoxi-benciloxi-carbonilo y etilamino-carbonilo) y el grupo tetrahidropirán-2-ilíco.

Los materiales de partida de las fórmulas III, IV y V son nuevos y se apreciará que forman también parte de este invento.

15. Los materiales de partida pueden prepararse de manera ya conocida utilizando los grupos protectores usuales, en especial los que se han mencionado antes.

- Ejemplos de grupos carboxil-protectores son los 20. ésteres de O y S (por ejemplo, los ésteres de metilo, etilo, tercibutilo, bencilo, cianometilo, ftalimidometilo, 4-picolilo, 2-p-tosiletilo, fenilo, p-nitrofenilo, tiofenilo y p-nitrobencilo), las amidas y las hidracidas (por ejemplo, tritil-, fenil-, carbobenzoxi- y tercibutoxi-carbonil-hidrácida). El grupo carboxílico puede protegerse además 25. mediante formación de sal.

Ejemplos de grupos carboxílicos activados son ésteres tales como los de cianometilo, p-cianofenilo, p-nitrofenilo, tiofenilo, p-nitrotiofenilo, 1-benzotriazolilo, 1-succinimidilo, 1-piperidilo, 3-quinolilo, 5-cloro-8-qui-

403373



- en el aspecto de la intensidad de la acción como de la duración de ésta, los nonapéptidos proporcionados por este invento son superiores a la arginino-vasotocina natural (Ile^3 -arginino-vasopresina) y a la Iou^4 -oxitocina preparada por V.J. Eruby y col. (J. Biol. Chem. 244, 3890-1969-), un análogo de hormona neurohipofisaria que despliega la actividad natriurética más intensa que se conocía hasta ahora. La actividad hipertensora de los nonapéptidos proporcionados por este invento es menor que la de la arginino-vasotocina, de modo que la actividad natriurética de estos nonapéptidos está aumentada selectivamente en comparación con la actividad hipertensora. Otra ventaja más de los nonapéptidos proporcionados por este invento y especialmente de la Ile^3 , Iou^4 -arginino-vasopresina, en comparación con la arginino-vasotocina y la Iou^4 -oxitocina, radica en que la excreción de sodio está selectivamente muy incrementada respecto a la excreción de potasio.
- 5.
- 10.
- 15.

- En virtud de las actividades biológicas mencionadas antes, estos nonapéptidos son aptos para el tratamiento de edemas de diversas clases y trastornos generales del metabolismo de los electrolitos, especialmente los trastornos de la retención de sodio.
- 20.

- La dosificación debe ajustarse de acuerdo con las necesidades individuales y puede variar entre 100 microgramos y 10 miligramos por dosis individual, administrada en una o varias veces por día. Estos nonapéptidos pueden administrarse en la forma de las bases libres o como sales con ácidos orgánicos o inorgánicos o con polímeros que contengan grupos de ácido (como, por ejemplo, la carboximetil-
- 25.

403973



- celulosa o el ácido tánico), ya sea solos, ya sea en forma de preparados farmacéuticos apropiados, por ejemplo, para administración oral, parenteral, enteral o intranasal. Para componer los preparados farmacéuticos, estos nonapéptidos pueden elaborarse con coadyuvantes inorgánicos u orgánicos que sean inertes y aceptables fisiológicamente.
- 5.

Ejemplos de tales coadyuvantes son :

- para las pastillas: lactosa, almidón, talco y ácido esteárico;
- 10. - para soluciones inyectables: agua, alcoholes, glicerina y aceites vegetales;
- para supositorios: aceites naturales y endurecidos y ceras naturales y endurecidas;
- 15. - para soluciones nebulizables intranasales: agua, glicerina y otras sustancias líquidas que sean toleradas por la membrana mucosa.

- Los preparados farmacéuticos pueden contener también, por ejemplo, agentes apropiados de conservación, de estabilización y de humectación, lo mismo que edulcorantes, colorantes y saporificantes.
- 20.

Los ejemplos que siguen ilustran el procedimiento proporcionado por este invento.

25.

Ejemplo 1

- a) Ester metílico de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína
-

A -10°C , se ajustó a pH de 8 aproximadamente, con adición de 2,8 cc de trietilamina, una solución de 8,4 g

403973



- de bromhidrato de éster metílico de L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína (preparado según R.A.Boissonnas y col., Helv. 38, 1491 -1955-) en 30 cc de dimetilformamida (DMF) y se la agitó con 7,8 g de éster p-nitrofenílico de Z-L-leucina. La mezcla solidificada se diluyó con unos 70 cc de agua y el precipitado se separó por filtración, se lavó con alcohol, con acetato de etilo y con éter y se secó. Punto de fusión: 195-197°C; $[\alpha]_D^{25} = -28,0^{\circ}$ (c = 1 en dimetilformamida).
- 5.
10. b) Hidrácida de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína
- Alrededor de 4°C, se trató con 1,5 cc de hidrato de hidracina una solución de 3 g de éster metílico de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína en una mezcla de 20 cc de dimetilformamida y 5 cc de sulfóxido de dimetilo. Se dejó reposar la mezcla a la temperatura del ambiente por 24 horas y se la filtró. Añadiendo agua al filtrado, se obtuvo un precipitado, que se separó por filtración, se lavó con agua y se secó. Punto de fusión :
15. 230-234°C; $[\alpha]_D^{25} = -38,2^{\circ}$ (c = 1,1 en dimetilformamida).
20. c) Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida
- A -20°C, se trató con 6 cc de ácido clorhídrico 2,5 N en tetrahidrofurano (THF) una suspensión de 2,25 g de hidrácida de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína en 25 cc de dimetilformamida. Se añadió a la solución 1 cc de nitrito de isoamilo, se agitó la mezcla a -20°C por 30 minutos, se la enfrió hasta -30°C y a esta temperatura, después de neutralización con 2,08 cc de trietilamina
- 25.

403973



- se la trató con una solución, en una mezcla de 10 cc de dimetilformamida y 10 cc de tetrahydrofurano, de 2,3 g de L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida, que se había preparado hidrogenando sobre carbón paladiado 3 g de Z-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida (obtenida según R.L. Huguenin y R.A. Boissonnas, Helv. 45, 1629 -1962-) en metanol, con presión normal a la temperatura del ambiente, luego se agitó la mezcla por una hora a -10°C, se la mantuvo por una noche en una nevera, se la filtró y se concentró el filtrado para eliminar el tetrahydrofurano. Después de diluir con dimetilformamida, se precipitó el hexapéptido por adición de agua y se le purificó lavándolo con alcohol y acetato de etilo. Punto de fusión: 180-182°C; $[\alpha]_D^{25} = -40,6^\circ$ (c = 0,5 en dimetilformamida).
5. 10. 15. d) Z-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida
- Se trató con 20 cc de ácido bromhídrico 4 N en ácido acético glacial una solución de 1,7 g de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-propil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida en 20 cc de ácido acético glacial. Se agitó la mezcla por 2 horas a la temperatura del ambiente, se la instiló a continuación en 500 cc de éter y el bromhidrato precipitado se lavó con éter, se socó y se disolvió en 20 cc de metanol. Luego se pasó la solución por una columna de Dowex2 (forma OH⁻), se concentró el eluato bajo presión reducida y se disolvió el residuo en 5 cc de dimetilformamida. Se añadió esta solución a una solución de acida de Z-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleu
20. 25.



- cina, la cual se había obtenido disolviendo 1,0 g de hidracida de Z-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucina (preparada según R.A. Boissonnas y col., Helv. 38, 1491 -1955-) en una mezcla de 5 cc de dimetilformamida y 4 cc de ácido clorhídrico 2,5 N en tetrahidrofurano, tratando la mezcla
5. a -20°C con 0,4 cc de nitrito de isoamilo y neutralizándola, después de agitarla por una hora a -20°C , mediante la adición de 1,11 cc de N-metilmorfolina. Se agitó la mezcla por 30 minutos a -20°C y a continuación se la mantuvo por
10. 25 horas a -30°C y por 25 horas a $+4^{\circ}\text{C}$, se la concentró y se la filtró. El precipitado que se obtuvo añadiendo alcohol/agua (1:1) al filtrado se separó por filtración, se disolvió en dimetilformamida, se precipitó una vez más utilizando acetato de etilo y por último se lavó con acetato de
15. etilo y con éter y se secó; punto de fusión: $213-216^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -40,2^{\circ}$ ($c = 0,5$ en dimetilformamida).
- e) Diacetato de [ile³, leu⁴]-arginino-vasopresina
- Se redujeron con sodio 500 mg de Z-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-
20. -S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida en 400 cc de amoníaco líquido. Después de eliminar el amoníaco, se disolvió el residuo en 500 cc de agua que contenían unas gotas de ácido acético glacial y se ajustó la solución a pH 6,8 con NaOH. A continuación se añadieron
25. 66,5 cc de una solución 0,01 molar de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, mientras se mantenía el pH a 6,5-7,0 por adición de un poco de hidróxido sódico. Se mantuvo la mezcla por 15 horas a la temperatura ambiente y se la pasó por una columna de Amberlite IR-45 (forma Cl^-). Se acidificó el eluato con ácido acéti-

403973



- co y se la absorbió en Amberlite CG-50 (forma H⁺). Después de lavar con 500 cc de ácido acético al 0,2%, se eluyó con una mezcla de piridina/ácido acético glacial/agua (30:4:66) y se liofilizó el eluato dos veces con recogida intermedia-
5. ria en agua. Para mayor purificación, se disolvió el liofilizado en 3 cc de una tampón 0,5-molar de acetato amónico (pH = 6,4) y se cromatografió una vez más en una columna de Amberlite CG-50 (forma H⁺). Se liofilizó el eluato varias veces. Rendimiento: 120 mg; $\frac{[\alpha]_D^{25}}{c} = 10,9^{\circ}$ (c = 0,5, en ácido acético 1 N).
- 10.

Electroforesis de papel:

Tampón de 2 cc de ácido acético glacial y 20 cc de piridina, completado con agua hasta 1 litro (pH = 6,0): Rf (arginina) = 0,51 ± 0,05.

15. Tampón de 37 cc de ácido fórmico y 25 cc de ácido acético, completado con agua hasta 1 litro (pH = 1,7): Rf (arginina) = 0,52 ± 0,05.

20. La $\text{Ile}^3, \text{Leu}^4$ -arginino-vasopresina bruta puede purificarse también sometiendo el eluato, después de eliminar el ferricianuro y los iones de ferricianuro por medio de Amberlite IR-45 (forma Cl⁻), a cromatografía de partición en Sephadex G-25 con los sistemas de disolvente 1-butanol/piridina/ácido acético 0,2 N (10:7:24) y 1-butanol/etanol/piridina/ácido acético 0,2 N (16:1:2:28).

25.

Ejemplo 2

a) Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida

Se disolvieron en 100 cc de ácido acético glacial 18,0 g de Z-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-pro-



- lil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida (preparada según R.L. Huguenin y R.A. Boissonnas, Helv. 49, 695 -1966-) y se trató la solución con 100 cc de una solución 5 N de HBr/ácido acético glacial. Se agitó la mezcla por 45 minutos a la
5. temperatura del ambiente y a continuación se la instiló en 1 litro de éter. El bromhidrato del pentapéptido que se precipitó se lavó con éter, se secó sobre KOH y P₂O₅ y se disolvió en 100 cc de metanol. Se pasó la solución por una
10. columna de Dowex 2 (forma OH⁻), se concentró el eluato bajo presión reducida y se disolvió el residuo en 100 cc de dimetilformamida. Se trató la solución a 0°C con 8,5 g de Z-L-leu-OPhNO₂, se mantuvo la mezcla a la temperatura del ambiente por 3 días, se precipitó por adición de 1 litro de acetato de etilo el hexapéptido protegido, se le lavó con
15. éter y con acetato de etilo y se le secó. Rendimiento: 16,3 g; punto de fusión: 183-185°C; [alfa]_D²⁵ = -41,6° (c = 0,5 en dimetilformamida).
- b) Z-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida
20. De 16,0 g de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida se escindió el grupo Z-protector de la manera que se ha descrito en la parte a) y la amina libre obtenida se hizo reaccionar con 6,0 g de Z-L-ile-OPhNO₂ en 100 cc de dimetilformamida.
25. Se mantuvo la mezcla a la temperatura del ambiente por 2 días, se precipitó por adición de 1 litro de acetato de etilo el heptapéptido protegido, se lavó el precipitado con éter, con acetato de etilo y con isopropanol y se le secó. Rendimiento: 13,1 g; punto de fusión: 211-212°C;



$[\alpha]_D^{25} = -41,92$ (c = 0,5 en dimetilformamida).

c) Z-O-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida

5. De 10,0 g de Z-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida se escindió el grupo Z-protector de la manera que se ha descrito en la parte a) y la amina libre resultante se hizo reaccionar con 4,5 g de Z-O-bencil-L-Tyr-
10. -OPhNO₂ en 100 cc de dimetilformamida. Después de 3 días de reposo a la temperatura ambiente, se precipito, por adición de acetato de etilo, el octapéptido protegido, que se lavó con acetato de etilo y etanol, se volvió a precipitar en ácido acético glacial/etanol, se lavó con etanol y se secó. Rendimiento: 8,4 g; punto de fusión: 237-238°C;
- 15.

$[\alpha]_D^{24} = -36,22$ (c = 0,5 en dimetilformamida).

d) Z-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida

20. Se disolvieron en 50 cc de ácido acético glacial 7,0 g de Z-O-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^G-tosil-L-arginil-glicinamida y se trató la solución con 50 cc de una solución 5 N de HBr/ácido acético glacial. Después de una hora de agitación, se instiló la mezcla en 1 litro de éter, se separó el precipitado por filtración, se le lavó con éter, se le volvió a precipitar en etanol/éter y se secó sobre P₂O₅ y KOH. Se disolvió en 50 cc de dimetilformamida el bromhidrato del octapéptido así obtenido, se ajustó la so-
- 25.



lución a pH 7,5 por adición de etildisopropilamina y se la trató con 2,7 g de Z-S-bencil-L-Cys-OPhNO₂. Después de 3 días de reposo a la temperatura del ambiente, se precipitó por adición de etanol el nonapéptido protegido, se le lavó con acetato de etilo y etanol y se le secó. Rendimiento: 4,7 g; punto de fusión: 220-223°C; $[\alpha]_D^{24} = -42,6^\circ$. ($c = 0,5$ en dimetilformamida).

5.

e) Diacetato de [ile³, leu⁴]-arginino-vasopresina

10.

El nonapéptido protegido se convirtió en el deseado diacetato de [ile³, leu⁴]-arginino-vasopresina de la manera que se ha descrito en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

a) Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-propil-N^ε-tosil-L-lisil-glicinamida

15.

Se trató a -20°C con 10,8 cc de ácido clorhídrico 2,5 N en tetrahidrofurano una suspensión de 2,4 g de hidracina de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína en 25 cc de dimetilformamida. Se añadió a esta solución 1 cc de nitrito de isoamilo, se agitó la mezcla por 40 minutos a -20°C, se la enfrió hasta -30°C y a esta temperatura, después de neutralizarla con 3,04 cc de N-metilmorfolina, se la trató con una solución en 10 cc de dimetilformamida de 1,9 g de L-propil-N^ε-tosil-L-lisil-glicinamida, que se había preparado hidrogenando sobre carbón paladiado, a la temperatura del ambiente y con presión normal, 2,5 g de Z-L-prolil-N^ε-tosil-L-lisil-glicinamida (obtenida según J.Meienhofer y V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc. 82, 2279 -1960-) en metanol. Luego se agitó la mezcla a -20°C por una hora, se la mantuvo a 4°C por una no-

20.

25.

403973



che y se la filtró. El hexapéptido protegido se precipi -
tó por adición al filtrado de ácido acético acuoso al 1%,
se separó por filtración, se lavó con alcohol y acetato de
etilo, se digirió con alcohol caliente y se secó. Rendi -
5. miento: 1,9 g; punto de fusión 217-218°C; $[\alpha]_D^{25} = -43,9^\circ$
(c = 1 en dimetilformamida).

b) Z-L-iso-leucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-
cisteinil-L-prolil-N ϵ -tosil-L-lisil-glicinamida

Se trató con 15 cc de ácido bromhídrico 5 N en
10. ácido acético glacial una solución de 1,2 g de Z-L-leucil-
L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N ϵ -tosil-L-
-lisil-glicinamida en 15 cc de ácido acético glacial. Se
agitó la mezcla por una hora a la temperatura del ambiente
y a continuación se la instiló en 300 cc de éter y el brom-
15. hidrato precipitado se lavó con éter, se secó y se disolvió
en 300 cc de metanol. Se pasó la solución por una columna
de Dowex 2 (forma OH⁻), se concentró el eluato bajo presión
reducida y se disolvió el residuo en 20 cc de dimetilforma-
mida. Luego se trató la solución con 0,54 g de Z-L-ile-
20. -O₂PhNO₂, se mantuvo la mezcla a la temperatura del ambiente
por 2 días, se precipitó por adición de acetato de etilo al
heptapéptido protegido, se le lavó con acetato de etilo y
con alcohol y se le secó. Rendimiento: 0,85 g; punto de
fusión 224-227°C; $[\alpha]_D^{25} = -43,9^\circ$ (c = 0,5 en dimetilfor-
25. mamida)

c) Tosil-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosil-L-iso-leucil-
L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-
prolil-N ϵ -tosil-L-lisil-glicinamida

De 0,8 g de Z-L-iso-leucil-L-leucil-L-asparagi -



- nil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^ε-tosil-L-lisil-glicinamida se escindió el grupo Z-protector de la manera que se ha descrito en la parte b) y la amina libre obtenida se disolvió en 6 cc de dimetilformamida. Se agregó esta solución a una solución de acida de tosil-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosina, que se había obtenido disolviendo 0,31 g de hidracida de tosil-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosina (obtenida según J. Honzl y J. Rudinger, Coll. Czech. Chem. Comm. 20, 1190 -1955-) en una mezcla de 3 cc de dimetilformamida y 1,5 cc de ácido clorhídrico 2,5 N en tetrahidrofurano, tratando la mezcla a -20°C con 0,15 cc de nitrito de isoamilo y neutralizándola, después de agitación a -20°C por 40 minutos, mediante la adición de 0,42 cc de N-metilmorfolina. Se agitó la mezcla por una hora a -20°C, se la mantuvo por 8 días a 4°C y se la filtró. El precipitado obtenido añadiendo agua al filtrado se separó por filtración, se suspendió en alcohol hirviente, se filtró, se disolvió en un poco de dimetilformamida, se volvió a precipitar por adición de alcohol y se secó. Rendimiento: 0,47 g; punto de fusión: 223-225°C; $[\alpha]_D^{25} = -29,8^\circ$ (c = 0,5 en dimetilformamida).
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.

d) Diacetato de [ile³, leu⁴]-lisino-vasopresina

- La conversión de 250 mg de tosil-S-bencil-L-cisteinil-L-tirosil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N^ε-tosil-L-lisil-glicinamida en diacetato de [ile³, leu⁴]-lisino-vasopresina se efectuó de manera análoga al método que se ha descrito en el Ejemplo 1. Rendimiento: 99 mg; $[\alpha]_D^{25} = 3,6^\circ$ (c = 0,5 en ácido acético 1 N).
Electroforesis de papel:
- 25.



- Tampón de 2 cc de ácido acético glacial y 20 cc de piridina, completado con agua hasta 1 litro (pH = 6,0): Rf (lisina) = 0,59 ± 0,05. Tampón de 37 cc de ácido fórmico y 25 cc de ácido acético, completado con agua hasta 1 litro (pH = 1,7): Rf (lisina) = 0,44 ± 0,05.

Los ejemplos que siguen ilustran preparaciones farmacéuticas típicas que contienen los nonapéptidos proporcionados por este invento.

Ejemplo A

10. Unas pastillas sublinguales contienen los ingredientes siguientes:

a) Diacetato de (ile³, leu⁴)-arginino-

vasopresina 5,83 mg

Lactosa 66,17 mg

15. Azúcar en polvo 20,00 mg

Kollidon K 25 7,00 mg

Estearato de magnesio 1,00 mg

100,00 mg

b) Diacetato de (ile³, leu⁴)-arginino-

20. vasopresina 11,66 mg

Lactosa 71,34 mg

Manitol 60,00 mg

Hidroxipropil-metilcelulosa 5,00 mg

Estearato de magnesio 2,00 mg

25. 150,00 mg

Ejemplo B

Una solución inyectable en ampollas de 5 cc contiene por cc los ingredientes siguientes:

Diacetato de (ile³, leu⁴)-arginino-va-

403973



sopresina	0,12 mg
NaCl	9,00 mg
HCl 0,1 N a pH 3,5	c.s.
H ₂ O para inyección	hasta 1,0 cc

5.

Ejemplo C

Un liofilizado contiene los ingredientes siguientes:

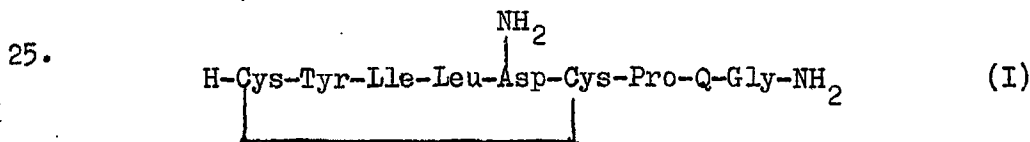
	<u>Partes en peso</u>
10. Diacetato de (ile ³ , leu ⁴)-arginino-vasopresina	11,60
Acido málico levógiro	1,74
Manitol dextrógiro	<u>150,00</u>
	163,34

15. Para producir una solución inyectable lista para el uso de disualven 163,34 mg de este liofilizado en 10 cc de agua destilada.

REIVINDICACIONES

20. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente suiza n^o 8921/71 del 18 de Junio de 1971.

1. Un procedimiento para la preparación de nonapéptidos de la fórmula general

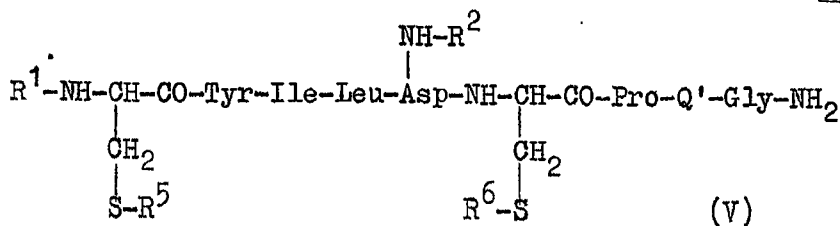


en la que

Q representa el radical de la arginina o de la lisina y

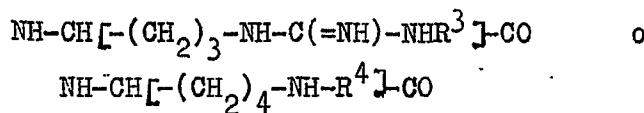


403973



5. en la que
- R¹ representa un átomo de hidrógeno o un grupo amino-protector;
 - R² representa un átomo de hidrógeno o un grupo amido-protector;

10. Q' representa una agrupación de la fórmula



donde

15. R³ representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector del radical guanidínico;
- R⁴ representa un átomo de hidrógeno o un grupo amino-protector que protege el radical lisínico;

20. R⁵ y R⁶ representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo sulfidrilo-protector (con tal de que uno a lo menos de los símbolos R¹, R² y R³ o R⁴ represente un grupo protector);

25. y todos los aminoácidos que contienen un átomo de carbono asimétrico presentan la configuración L,

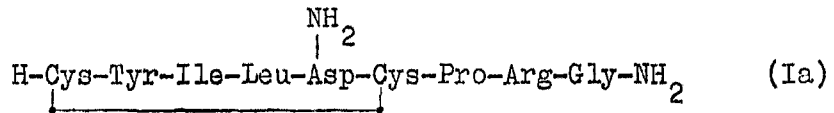
con escisión simultánea del grupo protector o los grupos protectores y, si se desea, convertirse el producto obte-





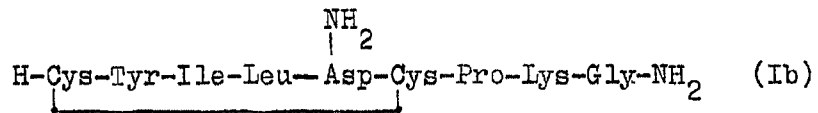
nido, por tratamiento con un ácido orgánico o inorgánico, en una sal de adición de ácido atóxica y utilizable farmacéuticamente.

- 4.- Un procedimiento según las reivindicaciones, anteriores caracterizado porque particularmente se prepara un compuesto de la fórmula



- 10. en la que todos los aminoácidos que contienen un átomo de carbono asimétrico presentan la configuración L, o una sal suya de adición de ácido, atóxica y utilizable farmacéuticamente.

- 15. 5.- Un procedimiento, según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque también particularmente se prepara un compuesto de la fórmula



- 20. en la que todos los aminoácidos que contienen un átomo de carbono asimétrico presentan la configuración L, o una sal suya de adición de ácido, atóxica y utilizable farmacéuticamente.

- 25. 6.- Un procedimiento según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque especialmente, se prepara diacetato de (ile³, Leu⁴)-arginio-vasopresina.

7.- Un procedimiento, según las reivindicaciones anteriores caracterizado porque también especialmente, se

403973



prepara diacetato de (ile³, leu⁴), lisino-vasopresina.

8.- Un procedimiento para la preparación de nonapéptidos.

5. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 27 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 17 de Junio 1972

p.a.

JAIMÉ ISERN

P. P.

Firmado: JOSE L. MORA

