



407222

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,
sus territorios y plazas de soberanía, a
favor de:

D. ARTURO BLADÉ FONT

y

D. SANTIAGO AGUILÁ SALOMÓ

de nacionalidad mejicana y española res-
pectivamente, con domicilio en Barcelona,
calle Maestro Pérez Cabrero 11 y Travesera
de las Corts 174, relativa a:

"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LA
L-PIROGLUTAMIL-L-HISTIDIL-L-PROLINAMIDA"

=====

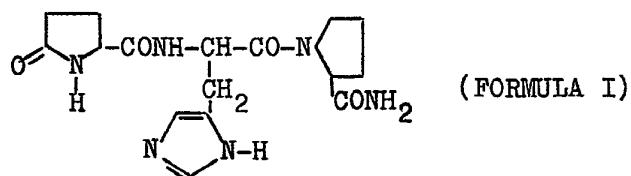
407222

Int. Cl.: C07D//A61K



MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención tiene por objeto un nuevo procedimiento para la preparación de la L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida representada por la fórmula: - - -



5. Según han demostrado recientemente varios autores (R. Burgus y col., *Endocrinology*, 86, 573 (1970); C.Y. Bowers y col., *Endocrinology*, 86, 1143 (1970); K. Folkers y col., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 37, 123, 705 (1969); R. Burgus y col., *Nature*, 226, 321 (1970))
10. este tripéptido resulta ser química y fisiológicamente idéntico a la hormona liberadora de la tirotropina. Farmacológicamente esta hormona (abreviadamente TRH) actúa en hombre como un poderoso estimulante de la secreción de tirotropina.

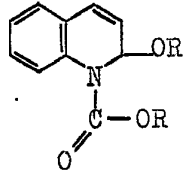
15. La L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida o TRH ha sido ya sintetizada siguiendo diferentes procedimientos (Folkers y col., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 39, 110 (1970); H.C. Beyerman y col., *Recueil de Travaux Chimiques Pays Bas*, 90, 791 (1971); H. Sievertsson, *Acta Pharmaceutica Suecica*, 9, 19 (1972); C.M.

407222



- Baugh y col., *Endocrinology*, 87, 1015 (1970); D. Gillessen y col., *Helvetica Chimica Acta*, 53, 63 (1970); K. Folkers y col., *Journal of Medicinal Chemistry*, 14, 476 (1971)), pero sólo en contadas ocasiones dichas síntesis emplean directamente el ácido piroglutámico, producto sin embargo fácilmente accesible, en las condensaciones peptídicas que conducen finalmente a la TRH. La dificultad estriba en las frecuentes reacciones secundarias que el grupo NH lactámico del ácido piroglutámico provoca cuando se trata de condensar este ácido con aminas o aminoésteres utilizando los clásicos reactivos de condensación peptídica. Para evitar tales dificultades la mayoría de las síntesis descritas recurren al empleo de derivados del ácido piroglutámico en los cuales el NH lactámico está bloqueado por algún grupo que es eliminado en una fase posterior de la síntesis. Sin embargo, por lo general, dichos derivados no pueden obtenerse directamente a partir del ácido piroglutámico sino que se preparan normalmente a partir del ácido glutámico con rendimientos no siempre buenos. - - - - -
- 5.
- 10.
- 15.
20. Por otra parte, son conocidas, como reactivos de condensación peptídica las 1-alquiloxicarbonil-2-alquiloxi-1,2-dihidroquinoleínas (M. Fieser and L.F. Fieser, "Reagents for Organic Synthesis", Vol. II, Wiley Interscience, New York, 1969, p. 191; Y. Kiso and H. Yajima, *Chemical Communications*, 942 (1972)), representadas por la fórmula:
- 25.

407222



(FORMULA II)

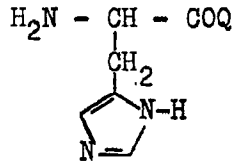
5. en la cual R es igual a un radical etilo o isobutilo y R' es igual a un radical metilo, etilo o isobutilo. Sin embargo, hasta el presente, estos reactivos de condensación peptídica no han sido utilizados para la preparación de la L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida o TRH a partir del ácido L-piroglutámico. - - - - -

10. Ahora bien, nosotros hemos encontrado que dichas l-alquiloxycarbonil-2-alquiloxi-1,2-dihidroquinoleínas permiten condensar directamente el ácido L-piroglutámico con aminoésteres o con péptidos que tengan un grupo NH₂ terminal libre, sin que la presencia del grupo NH libre en la molécula del ácido piroglutámico interfiera en las condensaciones. Además, el empleo de dichas l-alquiloxycarbonil-2-alquiloxi-1,2-dihidroquinoleínas permite completar las otras reacciones de síntesis peptídica que conducen finalmente a la TRH.

20. De acuerdo con la invención, para la preparación de la L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida representada por la antecitada fórmula I, se emplean l-alquiloxycarbonil-2-alquiloxi-1,2-dihidroquinoleínas de la fórmula general II como agentes de condensación peptídica entre las unidades peptídicas que integran la molécula y en particular entre el ácido L-piroglutámico y los derivados de la L-histidina de la fórmula general: - - - - -

407222

2 OCT



en la cual Q representa un radical alquiloxi o aralquiloxi o un resto de L-prolinamida unida por su nitrógeno cíclico al grupo histidilo. - - - - -

5. Dado que la TRH es un tripéptido lineal, el procedimiento según la invención puede ser ejecutado bajo dos procesos operatorios distintos, según el orden en que se combinen los tres aminoácidos que componen la TRH. Estos dos procesos operatorios difieren en la necesidad de proteger el grupo carboxilo o el amino del aminoácido intermedio, o sea la L-histidina. De un modo esquemático los dos procesos operatorios para la ejecución del procedimiento son los que se indican a continuación, haciendo uso de las abreviaciones siguientes: - - - - -

15. AADQ : 1-alquiloxicarbonil-2-alquiloxi-1,2-dihidroquinoleínas usadas como agentes de condensación
- (Piro)Glu-OH : ácido piroglutámico
- His-OR : éster de histidina
- Ac-His-OH : N α -acilhistidina
20. Pro(NH₂) : prolinamida

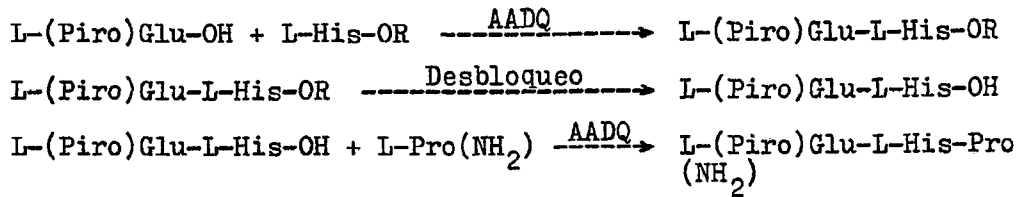
Los esquemas de los dos procesos son: - - - - -

407222

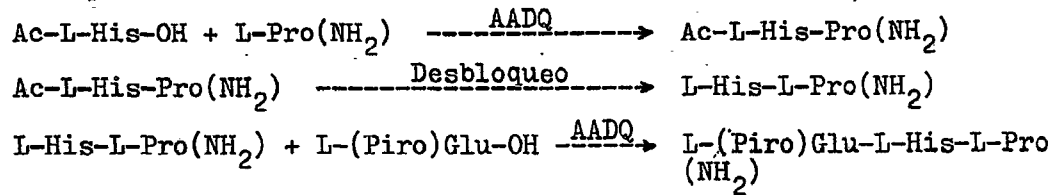
2 OCT.



Proceso 1:



Proceso 2:



En estos dos esquemas el grupo R de la molécula His-OR representa un radical alquilo o cualquier otro de los normalmente utilizados en química de péptidos para bloquear el grupo carboxilo, como por ejemplo el bencilo, el bencidrilo, el ter-butilo, el tetrahidropiranilo, etc., y Ac en la molécula Ac-His-OH representa uno cualquiera de los radicales empleados corrientemente para proteger en las condensaciones peptídicas el grupo amino de los aminoácidos, como por ejemplo el formilo, el benciloxicarbonilo, el ter-butiloxi-carbonilo, el ter-amiloxicarbonilo, el p-toluen-sulfonilo, el ftaloilo, etc. - - - - -

De acuerdo con la naturaleza del radical R o Ac utilizado se libera, después de la primera condensación peptídica, el radical amino o carboxilo del dipéptido así obtenido, siguiendo alguno de los métodos clásicos ampliamente descritos en la literatura, antes de proceder a la segun

407222



da y última condensación. - - - - -

5. Para obtener los mejores resultados en las diferentes condensaciones peptídicas arriba señaladas hemos encontrado ventajoso trabajar en medio homogéneo. Ello se ha logrado utilizando como medio de reacción el dimetilsulfóxido, solo o acompañado de dimetilformamida. - - - - -

Los ejemplos siguientes sirven para describir más detalladamente la invención, sin por ello limitarla: - - -

Ejemplo 1: L-piroglutamil-L-histidina metil éster clorhidrato

10. Se disuelven 3,47 g (20,55 mM) de L-histidina metil éster en 8 ml de dimetilsulfóxido. Se añaden 2,92 g (10% exceso) de ácido L-piroglutámico y 6,34 g (25% exceso) de 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolefina. Se agita a temperatura ambiente durante 4 días, se destila al vacío
15. (1 mm Hg) el dimetilsulfóxido y se lava el residuo con éter. El aceite insoluble residual se trata con 30 ml de éter etílico y 1 ml de metanol con lo cual precipita la L-piroglutamil-L-histidina metil éster cruda que se filtra y lava con éter seguido de benceno. Se obtienen 5,35 g de dipéptido par-
20. cialmente salificado con ácido L-piroglutámico. Para purificarlo se transforma en clorhidrato. Para ello se disuelve el péptido crudo en 20 volúmenes de metanol, se añade 0,176 volúmenes de cloruro de tionilo y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. El ácido piroglutámico contaminante
25. se transforma así en piroglutamato de metilo, fácilmente so-



407222

luble. -----

Se destila al vacío el disolvente y el residuo se trata con éter etílico conteniendo 15% de metanol. Se filtra y lava con éter el clorhidrato de la L-piroglutamil-L-histidina metil éster así obtenido. -----

5.

El producto puede recristalizarse disolviéndolo en metanol y añadiendo éter etílico. Presenta un poder rotatorio de -21° (concentración: 2% en metanol) y el análisis elemental demuestra que el producto está solvatado con una molécula de metanol. -----

10.

Análisis calculado para $C_{12}H_{16}N_4O_4 \cdot HCl \cdot CH_3OH$:
 % C = 44,73; % H = 6,03; % N = 16,14; % Cl = 11,2
 Encontrado:
 % C = 44,7; % H = 6,35; % N = 16,0; % Cl = 10,2

El espectro infrarrojo disperso en Nujol presenta bandas características a 3280 cm^{-1} (NH), 1748 cm^{-1} (carbonilo), 1685 cm^{-1} (amida I) y 1565 cm^{-1} (amida II). -----

15.

Calentado sobre el banco de Kofler el producto funde de una manera poco definida entre 150 y 160° , solidifica y vuelve a fundir a los 190° . -----

20.

La pureza óptica del dipéptido se determinó transformándolo en hidracida por tratamiento con hidrato de hidracina en solución metanólica. La hidracida obtenida presenta

407222



un poder rotatorio de -17° (concentración: 1% en agua) comparado con el de $-14,7^{\circ}$ indicado en la literatura. (D. Gillissen y col. Helvetica Chimica Acta, 53, 70 (1970)). La pureza óptica del producto es pues superior, aparentemente, al del dipéptido obtenido en la síntesis de la referencia indicada. - - - - -

5.

Ejemplo 2: L-piroglutamil-L-histidina

Se disuelven 1,32 g (4,18 mM) de L-piroglutamil-L-histidina metil ester clorhidrato en 10 ml de metanol. Se añaden gota a gota 8,8 ml de NaOH 1N (5% exceso) al mismo tiempo que se agita la solución de reacción con un agitador electromagnético. Se agita durante 15 minutos, se añaden 4,6 ml. de ácido clorhídrico 1N, se evapora a sequedad al vacío de la trompa de agua calentando en baño maría a una temperatura inferior a los 60° . El residuo se acaba de deshidratar añadiendo una mezcla 1:1 de etanol-tolueno y volviendo a evaporar a sequedad. Se añaden 20 ml de metanol al residuo y se filtra el cloruro sódico insoluble. - - - - -

10.

15.

Por evaporación del metanol se obtiene la L-piroglutamil-L-histidina que se emplea sin ulterior purificación en la reacción siguiente de condensación con la L-prolinamida.-

20.

Ejemplo 3: L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida

A la L-piroglutamil-L-histidina obtenida según se describe en el ejemplo 2 se le añaden 0,480 g (4,18 mM) de



L-prolinamida (R.W. Chambers y F.H. Carpenter, Journal American Chemical Society, 77, 1522 (1955)) y se disuelve la mezcla en 2 ml de dimetilsulfóxido y 8 ml de dimetilformamida. Se añaden 1,342 g de 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-di-hidroquinoleína y se agita 3 días a temperatura ambiente. -

5.

Se destilan al vacío (1mm Hg) los disolventes y el residuo se trata con 25 ml de tetrahidrofurano. El producto obtenido se filtra y lava con tetrahidrofurano. Para purificar el tripéptido se cromatografía sobre alúmina neutra de actividad III eluyendo la L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida con mezcla cloruro de metileno-metanol (40:60). Las fracciones que contienen el tripéptido se reúnen y el residuo obtenido por evaporación de los disolventes se disgrega en 25 ml de tetrahidrofurano, se filtra y se lava con el mismo disolvente. Después de secar al vacío sobre pentóxido de fósforo se obtienen 0,550 g (rendimiento 72%) de L-pi-roglutamil-L-histidil-L-prolinamida. - - - - -

10.

15.

El producto es higroscópico y su punto de fusión indefinido. Su poder rotatorio es de -33° (concentración: 1% en metanol). - - - - -

20.

A la cromatografía en capa fina sobre gel de sílice Merck PF₂₅₄ presenta, revelando con yodo o con reactivo de Pauly, una sola mancha de Rf 0,30 (disolvente: MeOH 3: CHCl₃ 6). La identidad del producto se ha confirmado comparándolo con la L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida obtenida por condensación de la L-piroglutamil-L-histidina con

25.

407222



L-prolinamida utilizando dicitclohexilcarbodiimida, según una de las síntesis descritas en la literatura. (K. Folkers y col., Journal of Medicinal Chemistry, 14, 476 (1971)). - -

Ejemplo 4: L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida

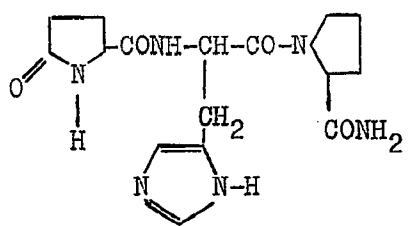
- 5. Se disuelve una mezcla de 1,35 g (5 mM) de L-histidil-L-prolinamida y 0,710 g (5,5 mM) de ácido L-piroglutámico en 9 ml de dimetilformamida y 3 ml de dimetilsulfóxido. Se añaden 1,50 g (6 mM) de 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína y se agita durante 3 días a temperatura ambiente.
- 10. El productos se recupera y purifica de la manera indicada en el ejemplo 3. - - - - -

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: ---

15. R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- Procedimiento para la preparación de la L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida, de la fórmula: - - - - -



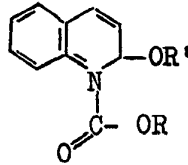
caracterizado por comprender el empleo de 1-alquiloxicarbonil-2-alquiloxi-1,2-dihidroquinoleinas de la fórmula general

Handwritten signature or initials.

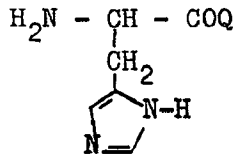
407222



2 OCT.



5. en la que R representa un radical etilo o isobutilo y R' re-
 presenta un radical metilo, etilo o isobutilo, como agentes
 de condensación peptídica entre las unidades peptídicas que
 integran la molécula y en particular entre el ácido L-piro-
 glutámico y los derivados de la L-histidina de la fórmula
 general: - - - - -



en la cual Q representa un radical alquiloxi o aralquiloxi
 o un resto de L-prolinamida unida por su nitrógeno cíclico
 al grupo histidilo. - - - - -

10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, carac-
 terizado por comprender la reacción del ácido L-piroglutámi-
 co con la L-histidina metil ester utilizando como agente de
 condensación la 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolei-
 na. - - - - -

15. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, carac-
 terizado por comprender la reacción del ácido L-piroglutámi-
 co con la L-histidil-L-prolinamida utilizando como agente de
 condensación la 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolef-
 na. - - - - -

Handwritten signature or initials, possibly 'MM', written in dark ink.

407222



2 OCT. 1972

- 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por comprender la reacción de la L-piroglutamil-L-histidina con L-prolinamida utilizando como agente de condensación la 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleina. - -
- 5. 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por emplear como medio de reacción de las condensaciones peptídicas el dimetilsulfóxido, solo o acompañado de dimetilformamida. - - - - -
- 6.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LA L-PIROGLUTAMIL-L-HISTIDIL-L-PROLINAMIDA". - - - - -
- 10.

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de trece hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

MADRID, 2 OCT. 1972

P. A. M. CURELL SUÑOL

mpm.