

F. C. 31-V-75

-9



10589

P.-54.307

05158-67/PF/szf

MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl.: <u>C07C</u>

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de RICHTER GEDEON VEGYÉSZETI GYÁR RT.

entidad húngara

establecida en Gyömrői ut 21, Budapest X, Hungría

por: "UN. PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE POLIPEPTI-
DOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS"

(Clase Internacional C07c)

2-5-73

- 1 -



414589

Este invento se refiere a un nuevo procedimiento para la preparación de polipéptidos biológicamente activos que contienen un grupo aspartilo, sobre todo un resto aspartil-glicina.

5 Tal como es sabido de la bibliografía, cuando se sintetizan péptidos aspárticos, el grupo β -carboxamido se convierte por deshidratación, con facilidad, en un derivado de β -ciano-alanina (M. Bodánszky, V. du Vigneaud; J. Am. Chem. Soc. 81, 5688/1959/; E. Schröder, K. Lübke : Peptides I, página 110), y los péptidos que contienen un radical aspartilo esterificado -
10 en el grupo β -carboxi se convierten con facilidad en derivados cíclicos de succinimida (E. Schröder, K. Lübke; Peptides I, página 203; M. A. Ondetti y otros: Biochemistry 7, 4069/1968). Esta última reacción se desarrolla con particular facilidad cuando el radical de asparagina está unido a un radical de glicina en la cadena del péptido. Así, por ejemplo, el tetrapéptido sintético Pro-Asn-Gli-Pro experimenta una completa desaminación incluso en una solución 0,1 molar de amoníaco
15 (L. Gráf y otros : Polypeptide Hormones, página 255, Akadémia Kiadó, Budapest /1971/). Con el fin de evitar estas dificultades, los grupos protectores de carboxamida se utilizan hoy día cada vez con mayor frecuencia
20 en la síntesis de péptidos que contienen el grupo as-

414589



partilo (véase por ejemplo W. König, R. Geiger; Ber. 103, 2041/1970/), y en la bibliografía no puede encontrarse ningún ejemplo de la acilación con una sucesión de aspartil-glicina.

5 El hecho de que, según los exámenes más recientes, la estructura originalmente atribuida a las hormonas - adrenocorticotrópicas deberá ser modificada ligeramente, puede ser explicado también por la fácil desaminación - del grupo carboxamido del resto aspartil-glicina. En --
10 efecto, la comparación sistemática de los preparados naturales y sintéticos condujo a la conclusión de que el grupo carboxamido, que originalmente se suponía estaba en la posición 30, está en realidad en la posición 25, y puede encontrarse una sucesión Gli-Ala en las posiciones
15 nes 26 a 27 tanto en las hormonas adrenocorticotrópicas de porcinos como en las hormonas adrenocorticotrópicas de seres humanos. Correspondientemente, la estructura - de la hormona adrenocorticotrópica humana es la siguiente:

20 H-Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-Asn-Gli-Ala-
14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
25 Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH
28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

414589



La síntesis de hormona adrenocorticotrópica humana que tiene una estructura tal como se describe por T. H. Lee y otros (J. Biol. Chem. 236, 2970/1961/), así como de los fragmentos de esta hormona fue descrita por primera vez en la patente húngara número 155.254 y en las correspondientes memorias de patente extranjeras, por ejemplo en la patente británica número 1.201.053.

Este invento se refiere a la síntesis de hormona adrenocorticotrópica humana con la estructura modificada antedicha, así como también a la síntesis de sus fragmentos característicos de la especie individual.

Este invento está basado en el descubrimiento de que el método del pentafluorofenol (L. Kisfaludy y otros: - Proc. 8th Europ. Peptide Symp. 1966, página 25 /1967/, L. Kisfaludy y otros: J. Org. Chem. 35, 3563 /1970/, J. Kovács y otros, J. Am. Chem. Soc. 89, 183 /1967/), que hasta el momento no ha sido utilizado en la síntesis de polipéptidos biológicamente activos, es particularmente apropiado, en ciertas condiciones, para la síntesis de polipéptidos que contienen el grupo aspartilo y poseen una estructura similar a la arriba descrita.

Inesperadamente se ha encontrado que cuando la reacción se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 0°C el Z-Asn-OH puede ser convertido en su éster pentafluorofenílico con un rendimiento de al menos 90%, sin

414589



bloquear el grupo carboxamido. En estas condiciones -
prácticamente no se forman derivados cíclicos de suc-
cinimida ni compuestos de β -ciano-alanina. El Z-Asn-
-OPFP así obtenido puede ser utilizado para la acila-
5 ción de derivados de aminoácido o de péptido sin el -
peligro de reacciones secundarias. Así, por ejemplo,
el dipéptido bloqueado Z-Asn-Gli-OtBu puede ser prepa-
rado a partir del antedicho compuesto con un rendimien-
to superior al 90%, y éste último producto puede ser
10 convertido en Z-Asn-Gli-OH poniéndolo en contacto con
ácido trifluoroacético. Este último dipéptido puede -
ser convertido también en su éster pentafluorofenílico
con un excelente rendimiento, y el éster obtenido puede
ser utilizado para la acilación de los péptidos C-termi-
15 nales mencionados en los ejemplos (ACTH₂₇₋₃₁, ACTH₂₇₋₃₂,
ACTH₂₇₋₃₉). La acilación se desarrolla con un excelente
rendimiento y no se producen reacciones secundarias.

La ventaja adicional del método de pentafluorofeni-
lo puede ser puesta de manifiesto muy nítidamente cuan-
do se sintetizan péptidos superiores que contienen el
20 grupo aspartilo. En efecto, de acuerdo con las observa-
ciones de la solicitante, el pentafluorofenol que se des-
prende en el curso de la acilación no provoca las dificul-
tades que pueden aparecer en muchos de los casos, por --
25 ejemplo cuando se emplea el método del pentaclorofenol

414589



(memoria de patente británica número 1.201.053). En efecto, una desventaja del método del pentaclorofenol es que la reacción de copulación conduce a un equilibrio, y se requiere una cantidad en exceso del compuesto de amina o una base terciaria con el fin de preparar el producto pretendido con un rendimiento aceptable. Sin embargo, cuando se utiliza el método del pentafluorofenol no es necesaria una cantidad en exceso de una base. Esta observación parecía estar en contradicción con el hecho de que, según la bibliografía, el pentafluorofenol y el pentaclorofenol tienen valores de p_k idénticos ($p_k = 5,3$). Sin embargo, se ha encontrado que los valores de p_k de estos derivados fenólicos difieren marcadamente entre sí en un medio de dimetilformamida; en donde el pentaclorofenol manifiesta un valor de p_k de 5,05, mientras que el respectivo valor para el pentafluorofenol es de 6,35. En otras palabras, el pentafluorofenol se disocia en dimetilformamida en un grado menor que el pentaclorofenol, y consiguientemente no se efectúan la protonación estable del componente de base y el retardo de la reacción de copulación.

Una ventaja más del método del pentafluorofenol reside en el hecho de que el pentafluorofenol puede ser eliminado con facilidad desde el producto de reacción. La eliminación de pentaclorofenol o de sus sales formadas con bases orgánicas es muchísimo más difícil, y los

414589

- 9 MAYO



5 vestigios de estos compuestos que quedan en la mezcla de reacción conducen a la formación de ácido clorhídrico en la subsiguiente operación de hidrogenación catalítica. No obstante, el ácido clorhídrico formado de este modo daña a los grupos bloqueadores sensibles a los ácidos. Por otra parte, el pentafluorofenol puede ser eliminado con facilidad y de manera cuantitativa vertiendo la mezcla de reacción en éter; por lo tanto, pueden evitarse las desventajas anteriores.

10 Desde un punto de vista práctico constituye una ventaja importante el hecho de que los ésteres pentafluorofenólicos sean muchísimo más solubles en disolventes orgánicos que los respectivos compuestos pentaclorofenólicos. Así, por ejemplo, la cantidad de disolvente de dimetilformamida requerida en la preparación de Z-Asn-Gli-OPFP es sólo de 10% de lo que sería necesario si se preparase el respectivo éster pentaclorofenólico.

15 Se ha encontrado además que el método del pentafluorofenol es particularmente apropiado en la síntesis de péptidos superiores. De acuerdo con las publicaciones más recientes (véase por ejemplo R. Schwyzer, P. W. Schiller: Helv. Chim. Acta 54, 897 /1971/, E. Wünsch: Ber. 104, 2445 /1971/), la reacción debería llevarse a cabo a temperaturas elevadas y/o el agente de acilación debería ser añadido en exceso con el fin de obtener los produc-

414589



tos pretendidos con mejores rendimientos y con un grado de pureza más elevado. No obstante, cuando se utiliza el método del pentafluorofenol no hay necesidad de utilizar temperaturas elevadas ni cantidades en exceso del agente de acilación con el fin de llegar al mismo resultado. --

5 Así, por ejemplo, cuando se hace reaccionar el decapeptido bloqueado Z-Lis-(BOC)-Lis(BOC)-Arg(NO₂)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-OH con el heptapéptido H-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-(OtBu) o con

10 el octapéptido H-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu a la temperatura ambiente y en solución en dimetilformamida en la presencia de un complejo de pentafluorofenol y dicitclohexilcarbodiimida, la reacción termina prácticamente en el espacio de 5 a 6 horas (tal

15 como se pone de manifiesto por cromatografía en capa delgada), y el heptadecapéptido bloqueado (15-31) o el octadecapéptido bloqueado (15-32) puede ser aislado de modo simple y con un rendimiento de al menos 80%. Pueden lograrse resultados excelentes similares cuando se hace

20 reaccionar el tetradecapéptido ACTH 1-14 bloqueado descrito en la patente húngara número 155.880 con el heptadecapéptido 15-31, el octadecapéptido 15-32 o el pentacosapéptido 15-39, respectivamente, en las mismas condiciones que arriba se han descrito.

25 De acuerdo con un método alternativo, los compues-

414589



tos intermedios buscados pueden ser preparados también acilando el pentapéptido H-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-OH con el éster pentafluorofenilico de Z-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-OH, sometiendo al octapéptido obtenido a hidrogenación catalítica, eliminandose de este modo los grupos bloqueadores de nitro del radical guanidino del resto de arginina, y sintetizando escalonadamente el decapeptido 15-24 bloqueado. El compuesto obtenido difiere del decapeptido 15-24 bloqueado arriba descrito en el hecho de que los grupos guanidino del resto de arginina están presentes en forma protonada. La ventaja de esta última síntesis consiste en el hecho de que los péptidos C-terminales que contienen grupos bloqueadores sensibles a los ácidos no han de ser sometidos a la hidrogenación catalítica que se utiliza para la eliminación simultánea de los grupos nitro. Tal como ya es sabido, este último tipo de hidrogenación catalítica sólo se puede llevar a cabo en un medio de ácido acético y requiere un largo tiempo de reacción (en algunos casos incluso de varios días).

Correspondientemente, este invento se refiere a un nuevo método para la preparación de péptidos que representan la hormona adrenocorticotrópica humana y de sus fragmentos, que tienen la fórmula general (I)

H-Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-

414589



-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-
-Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Q

y de los derivados bloqueados de dichos compuestos, en donde Q puede representar los grupos

- 5 (a) Ser-OH,
- (b) Ser-Ala-CH,
- (c) Ser-Ala-Glu-OH,
- (d) Ser-Ala-Glu-Ala-OH,
- (e) Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-OH,
- 10 (f) Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-OH
- (g) Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-OH,
- (h) Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-CH,
- (i) Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH.

De acuerdo con el método del invento, en el curso
15 de la copulación de los compuestos intermedios bloqueados, el grupo carboxi del componente acilante es activado convirtiéndolo en el éster pentafluorofenílico. Los péptidos libres obtenidos después de eliminar los grupos bloqueadores son convertidos en sus sales por adición de ácido o complejos o condensados farmacéuticamente aceptables, respectivamente.
20

Los compuestos de partida y los compuestos intermedios son preparados de acuerdo con métodos convencionalmente utilizados en la química de los péptidos. En calidad de grupos bloqueadores de amino pueden utilizarse so
25

414589



bre todo grupos benciloxycarbonilo, ter.butoxicarbonilo
o para-clorobenciloxycarbonilo, mientras que el grupo -
carboxi es bloqueado de modo preferible mediante forma-
ción de éster, especialmente utilizando metanol, etanol
5. o ter.butanol como agente de esterificación. Si es nece-
sario, los grupos hidroxil unidos a las cadenas laterales
pueden ser bloqueados mediante formación de éster, por lo
cual pueden utilizarse en calidad de agentes de esterifi-
cación ter.butanol o alcohol bencilico. El grupo guanidi-
10 no del resto de arginina es bloqueado preferiblemente -
mediante un grupo nitro, pero la protonación del grupo -
guanidino ejerce también un efecto bloqueador apropiado.
Mediante la selección apropiada del grupo bloqueador in-
dividual puede asegurarse que éste pueda ser eliminado
15 selectiva o simultáneamente por acidólisis o hidrogenó-
lisis.

Los péptidos inferiores pueden ser sintetizados es-
calonadamente o mediante condensación de fragmentos. La
reacción puede llevarse a cabo por el método del anhí-
20 drido mixto, de la azida, del éster activado o de la -
diciclohexilcarbodiimida.

La característica principal del invento consiste en
que cuando se copulan péptidos que contienen el grupo as-
partilo, el grupo carboxi del componente acilante es ac-
25 tivado por conversión del mismo en su éster pentafluoro

414589



fenílico. El éster pentafluorofenílico puede ser preparado en una operación separada, o este agente de acilación puede ser formado directamente en la mezcla de reacción en donde se efectúa la acilación. El éster activado
5 puede ser preparado añadiendo pentafluorofenol y dicitclohexilcarbodiimida a la mezcla de reacción. De acuerdo con un método particularmente preferido, el complejo de pentafluorofenol y dicitclohexilcarbodiimida es preparado en una operación separada, y este complejo es introduci-
10 do en la mezcla de reacción en una cantidad de 1,2 a 1,5 moles. La ventaja de este último método consiste en que el complejo puede ser manipulado con mayor facilidad, y además los posibles contaminantes de dicitclohexilcarbodiimida que contienen azufre, los cuales pueden afectar des-
15 favorablemente a la siguiente operación de hidrogenación, pueden ser eliminados también durante la preparación del complejo.

La reacción de copulación de acuerdo con el invento se desarrolla con elevados rendimientos y sin la apari-
20 ción de reacciones secundarias. Consiguientemente, no es necesario purificar separadamente los compuestos intermedios bloqueados (por ejemplo por cromatografía en columna), ya que puede obtenerse un compuesto suficientemente puro por la sola purificación del producto final desblo-
25 queado. El producto final desbloqueado puede ser purifi-

414589



cado, por ejemplo, mediante reparto en contracorriente o mediante cromatografía en columna, utilizando por -- ejemplo varios tipos de carboximetilcelulosa en calidad de adsorbente.

5 Los péptidos preparados de acuerdo con el invento pueden ser convertidos en sus sales por adición de ácido y en sus complejos farmacéuticamente aceptables. Las sales pueden ser las formadas con ácidos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo con los ácidos acético, -
10 clorhídrico, sulfúrico o fosfórico, o con ácidos grasos superiores. El término "complejos farmacéuticamente aceptables" utilizado en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones se refiere a compuestos de los péptidos -
15 formados con ciertas sustancias orgánicas o minerales, - poseyendo dichos compuestos actividad prolongada. Las - sustancias orgánicas susceptibles de utilizarse para la preparación de los complejos son, por ejemplo, las siguientes: gelatinas, compuestos del tipo de carboximetil
20 celulosa, ésteres algínicos, polímeros de aminoácidos y otros homopolímeros y copolímeros. Entre las sustancias minerales, se han de mencionar las sales escasamente so
25 lubles de ciertos metales, especialmente de zinc, tales como fosfatos o pirofosfatos de zinc. Compuestos de actividad prolongada pueden ser preparados también ponien
do en contacto los péptidos con ciertos silicatos, que

414589



forman complejos o condensados insolubles con el pépti
do en cuestión. La estructura de estos complejos o con
densados no ha sido todavía determinada.

5 Los péptidos preparados de acuerdo con el invento
pueden ser utilizados en la terapia en la forma de pro
ductos farmacéuticos convencionales. Entre los produc
tos farmacéuticos han de mencionarse los siguientes: -
productos liofilizados sólidos, que contienen vehículos
o excipientes inertes, por ejemplo mannita, lactosa, al
10 midón, etc., además del agente activo; suspensiones y -
emulsiones que contienen opcionalmente agentes de con
servación inertes, estabilizadores y sustancias auxilia
res. El agente activo puede ser utilizado también en la
forma de los complejos y condensados arriba mencionados;
15 debido a su efecto prolongado, dichos productos farma
céuticos son preferidos de modo particular.

20 La dosis usual de las hormonas adrenocorticotrópi
cas es de 0,1 a 3,0 mg. Las hormonas pueden ser admi
nistradas por vía subcutánea, parenteral o intramuscu
lar, de 1 a 7 veces por semana.

El procedimiento del invento es explicado con de
talle en los siguientes Ejemplos no limitativos. Los -
compuestos intermedios descritos en los Ejemplos son -
sustancias nuevas.

25 Las abreviaturas utilizadas en los Ejemplos son -

414589



las aceptadas por IUPAC-IUB (J. Biol. Chem. 247, 977 /
/1972/). Los símbolos indicados entre paréntesis después
de los encabezamientos contienen los grupos N-terminales
y C-terminales y la numeración de la secuencia. Los gru-
5 pos protectores unidos a las cadenas laterales están in-
dicados en los encabezamientos entre paréntesis. Las --
otras abreviaturas siguientes fueron utilizadas asimismo:
DCC = dicitclohexilcarbodiimida, DCU = dicitclohexilurea,
PFPOH = pentafluorofenol, PCPOH = pentaclorofenol, DCHA =
10 = dicitclohexilamina, DMF = dimetilformamida; Z = grupo
benciloxicarbonilo; ONSu = grupo N-succinimido.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato
del tipo del Dr. Tottoli (Büchi, Suiza). Los exámenes
por cromatografía en capa delgada se llevaron a cabo so-
15 bre un absorbente de "gel de sílice de acuerdo con --
Stahl" en las siguientes mezclas de disolventes:

- 1) Acetato de etilo-(piridina-ácido acético-agua =
= 20:6:11) = 95:5
- 2) Acetato de etilo-(piridina-ácido acético-agua =
20 =20:6:11) = 9:1
- 3) Acetato de etilo-(piridina-ácido acético-agua =
= 20:6:11) = 4:1
- 4) Acetato de etilo-(piridina-ácido acético-agua =
= 20:6:11) = 3:2

25

414589



- 5) Acetato de etilo-piridina-ácido acético-agua =
= 240:20:6:11
- 6) Acetato de etilo-piridina-ácido acético-agua =
= 120:20:6:11
- 5 7) Acetato de etilo-piridina-ácido acético-agua =
= 60:20:6:11
- 8) Acetato de etilo-piridina-ácido acético-agua =
= 30:20:6:11
- 10 9) Acetato de etilo-piridina-ácido acético-agua =
= 480:20:6:11
- 10) Cloroformo - hexano - ácido acético = 8:1:1
- 11) Cloroformo-metanol = 98 : 2
- 12) Cloroformo-metanol = 95:5
- 13) Cloroformo-metanol = 9:1
- 15 14) Cloroformo-metanol = 85:5
- 15) n-butanol-piridina-ácido acético-agua = 30:20:6:24
- 16) Cloroformo-metanol-ácido acético = 8:1:1.

Las manchas fueron reveladas con ninhidrina y/o -
con cloro + tolidina.

20 Ejemplo 1.

Síntesis de ACTH₁₋₃₁ humana

Operación 1: Z-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu (Z-30-31-
-OtBu).

25 10,85 g (25 milimoles) de Z-Glu(OtBu)-ONSu son di
sueltos en 100 ml de acetato de etilo, y se vierten en

414589



la solución 7,0 g (27,5 milimoles) de H-Ser(tBu)-OtBu.
HCl. La suspensión obtenida es enfriada a 0°C y se le
añaden con agitación 3,85 ml (27,5 milimoles) de trie-
tilamina. La mezcla de reacción es agitada durante 0,5
5 horas a 0°C, y después de esto la agitación se continúa
a la temperatura ambiente durante la noche. La mezcla
es lavada sucesivamente dos veces con 20 ml de ácido -
clorhídrico 1 N, tres veces con 20 ml de NaHCO₃ 1 N y
con agua. La solución en acetato de etilo es secada, -
10 evaporada hasta sequedad y el residuo oleoso es tritu-
rado con éter de petróleo. Se obtienen 10,45 g (77,8%)
de Z-30-31-OtBu. P. de f. 92-95°C, $R_f^{11} = 0,8$.

Análisis para C₂₈H₄₄O₈N₂ (536,68)

Calculado % : C 62,7 H 8,3

15. Encontrado %: C 62,4 H 8,2

Operación 2: H-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu (H-30-31-
-OtBu)

2,5 g de paladio sobre carbón son añadidos a la so-
lución de 17,2 g (32 milimoles) de Z-30-31-OtBu en 350
20 ml de metanol y se hace borbotear hidrógeno gaseoso den-
tro de la mezcla durante una hora. El catalizador es --
eliminado por filtración, el producto filtrado es evapo-
rado hasta sequedad bajo presión reducida, el residuo
sólido es mezclado con éter de petróleo, y la mezcla es
25 filtrada. Se obtienen 10,97 g (83,4%) de H-Glu(OtBu)-

414589



-Ser(tBu)-OtBu. P. de f.: 78-82°C, $R_f^{11} = 0,4$.

Análisis para $C_{20}H_{38}O_6N_2$ (402,54):

Calculado %: C 59,7 H 9,5 N 6,9

Encontrado %: C 59,8 H 9,4 N 6,6

5 Operación 3: Z-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu
(Z-29-31-OtBu)

Una solución de 9,45 g (22,5 milimoles) de Z-Asp
(OtBu)-ONSu y 10,1 g (25 milimoles) de H-30-31-OtBu en
200 ml de acetato de etilo es dejada reposar durante la
10 noche, y después de ello la solución es lavada sucesiva-
mente dos veces con 50 ml de ácido clorhídrico 1 N, tres
veces con 50 ml de solución 1 N. de $NaHCO_3$ y con agua. -
El acetato de etilo es separado por destilación, y el -
residuo oleoso es triturado con agua. El sólido es sepa-
15 rado por filtración. Se obtienen 15,2 g (95,0%) de - -
Z-29-31-OtBu. P. de f. : 84-87°C, $R_f^{11} = 0,70$

Análisis para $C_{36}H_{57}O_{11}N_3$ (707,88) :

Calculado % : C 61,1 H 8,1

Encontrado % : C 61,3 H 8,3

20 Operación 4: Z-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-
-OtBu (Z-28-31-OtBu).

Una mezcla de 14,18 g (20 milimoles) de Z-29-31-OtBu,
280 ml de metanol y 2,1 g de paladio sobre carbón es hi-
drogenada durante 0,5 horas. El catalizador es separado
25 por filtración, y el producto filtrado es evaporado has-

414589



- ta sequedad bajo presión reducida. Los 11,65 g de residuo oleoso ($R_f^{11} = 0,2$) son hechos reaccionar con 8,25 g (19 milimoles) de Z-Glu(OtBu)-ONSu en 200 ml de acetato de etilo. La solución es dejada reposar durante la noche,
- 5 después de esto es lavada sucesivamente dos veces con - 50 ml de ácido clorhídrico 1 N, tres veces con 50 ml de solución 1 N de NaHCO_3 y con agua. La solución en acetato de etilo es secada, el disolvente es separado por destilación, el residuo sólido es triturado con n-hexano y
- 10 es filtrado. El producto bruto obtenido es disuelto en 43 ml de acetato de etilo caliente, y se añaden a la solución 7 ml de n-hexano. Al día siguiente los cristales separados son filtrados y secados. Se obtienen 13,0 g (76,5%) de Z-28-31-OtBu. P. de f. 184-185°C, $R_f^1 = 0,80$.
- 15 Análisis para $\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{O}_{14}\text{N}_4$ (893,1):
- Calculado % : C 60,5 H 8,1
Encontrado % : C 60,8 H 8,0
- Operación 5: H-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu (H-28-31-OtBu).
- 20 Una solución de 12,5 g (14 milimoles) de Z-28-31-OtBu en 250 ml de metanol es hidrogenada durante 0,5 horas en presencia de 1,8 g de paladio sobre carbón. El catalizador es eliminado por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo
- 25 sólido es triturado con n-hexano, y la mezcla es fil-

414589



trada. Se obtienen 10,09 g (95%) de H-28-31-OtBu. P. de f.: 139-140°C; $R_f^{11} = 0,25$.

Análisis para $C_{36}H_{66}O_{12}N_4$ (758,97):

Calculado % N 7,4

5 Encontrado N 7,6.

Operación 6: Z-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu (Z-27-31-OtBu).

6,62 g (8,7 milimoles) de H-28-31-OtBu son disueltos en 65 ml de acetato de etilo y se añaden a la solución 2,72 g (8,5 milimoles) de Z-Ala-ONSu. Después de 5 minutos de agitación se forma una solución homogénea. La mezcla de reacción es agitada durante una hora; en este momento el producto se separa de la mezcla. La mezcla es dejada reposar durante la noche, después de ello el producto es separado por filtración y lavado con acetato de etilo. El producto bruto es recristalizado en 65 ml de acetato de etilo. Se obtienen 6,61 g (80,7 %) de Z-27-31-OtBu. P. de f. : 193-195°C, $R_f^{11} = 0,75$.

15 Análisis para $C_{48}H_{77}O_{15}N_5$ (964,18)

20 Calculado %: C 59,8 H 8,1

Encontrado %: C 59,6 H 8,1

Operación 7: H-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu (H-27-31-OtBu).

25 6,61 g (6,85 milimoles) de Z-27-31-OtBu son disueltos en 150 ml de metanol con suave calentamiento. La so

414589



lución es enfriada a la temperatura ambiente; se le -
añade 1 g de paladio sobre carbón y se hace borbotear
hidrógeno gaseoso dentro de la mezcla durante 0,5 ho-
ras. El catalizador es eliminado por filtración, el -
5 producto filtrado es evaporado hasta sequedad, el re-
siduo sólido es triturado con n-hexano y la mezcla es
filtrada. Se obtienen 5,55 g (97,6%) de H-27-31-OtBu.
P. de f.: 138-142°C, $R_f^2 = 0,15$.

Análisis para $C_{40}H_{71}O_{13}N_5$ (830,05).

10 Calculado % : C 57,9 H 8,6 N 8,4
Encontrado % : C 57,7 H 8,3 N 8,1

Operación 8: Z-Asn-OPFP

1,33 g (5 milimoles) de Z-Asn-OH y 3,04 g de penta-
fluorofenol son disueltos en 3,5 ml de DMF, y se añaden
15 a la solución 10,5 ml de dioxano. La solución es enfria-
da a 0°C y se añaden con agitación 1,13 g (5,5 milimo-
les) de DCC. La mezcla de reacción es agitada a 0°C du-
rante 2 horas, después de ello la DCU es eliminada por
filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta -
20 sequedad bajo presión reducida. El residuo es triturado
con 8 ml de éter. La sustancia cristalina blanca obteni-
da es separada por filtración, lavada con una pequeña -
cantidad de éter frío y secada. Se obtienen 2,02 g ---
(93,3%) de Z-Asn-OPFP. P. de f. 149-150°C. $R_f^{10} = 0,35$.

25

414589



Análisis para $C_{18}H_{13}O_5N_2F_5$ (432,31):

Calculado % : C 50,0 H 3,0 N 6,5

Encontrado %: C 50,2 H 3,1 N 6,4

Operación 9 Z-Asn-Gli-OtBu (Z-25-26-OtBu)

5 0,43 g (1 milimol) de Z-Asn-CPFP son disueltos en
10 ml de dioxano con suave calentamiento. La solución
es enfriada a 10°C, y se le añaden 0,185 g (1,1 milimo-
les) de H-Gli-OtBu.HCl. Se añaden con agitación 0,154 ml
(1,1 milimoles) de trietilamina a la suspensión obtenida,
10 y la mezcla de reacción es agitada a la temperatura am-
biente durante 0,5 horas. Los sólidos son eliminados por
filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta se-
quedad. El residuo gelificado es triturado con éter, y -
el sólido es separado por filtración. Se obtienen 0,34 g
15 (89,8%) de Z-Asn-Gli-OtBu. P. de f. 150-151°C; $R_f^2 = 0,6$.

Análisis para $C_{18}H_{25}O_6N_3$ (379,42):

Calculado % : N 11,1

Encontrado % : N 11,2

Operación 10: Z-Asn-Gli-OH (Z-25-26-OH)

20 9,13 g (26 milimoles) de Z-Asn-Gli-OtBu son disuel-
tos en 90 ml de ácido trifluoroacético, y después de 0,5
horas de reposo se añaden a la solución 450 ml de éter
anhidro. El precipitado blanco separado es filtrado, la
vado con éter y cristalizado en 35 ml de agua. Se obtie-
25 nen 6,56 g (78%) de Z-Asn-Gli-OH. P. de f. 170-172°C,

414589



$$R_f^4 = 0,45.$$

Operación 11: Z-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-
-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu (Z-25-31-OtBu).

2,59 g (8 milimoles) de Z-Asn-Gli-CH₃, 6,65 g (8 milimoles) de H-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu y 4,86 g de pentafluorofenol son disueltos en 28 ml de DMF. La solución es enfriada a 0°C y se le añaden 1,81 g (8,8 milimoles) de DCC. La mezcla de reacción es agitada a 0°C durante 0,5 horas y se continúa la agitación a la temperatura ambiente durante 2,5 horas. La DCU separada es eliminada por filtración, el producto filtrado es evaporado hasta sequedad, y el residuo es triturado con acetato de etilo. Se obtienen 7,3 g (80,5%) de Z-25-31-OtBu. P. de f.: 194°C (con descomposición),

$$R_f^3 = 0,6.$$

Operación 12. H-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu (H-25-31-OtBu).

6,47 g (5,7 milimoles) de Z-25-31-OtBu son disueltos en una mezcla de 220 ml de etanol y 20 ml de DMF, y se hace borbotear hidrógeno gaseoso a través de la mezcla durante una hora en presencia de 1 g de paladio sobre carbón. El catalizador es eliminado por filtración, el producto filtrado es evaporado hasta sequedad, y el residuo gelificado es triturado con éter. El sólido es separado por filtración y lavado. Se obtienen 4,9 g (86,2%)



-9

414589

de H-25-31-OtBu. P. de f.: 174-176°C (con descomposición), $R_f^3 = 0,2$.

5 Operación 13: Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu (Z-15-31-OtBu).

7,4 g (4 milimoles) de Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-OH (véase patente británica número 1.201.053) y 4,2 g (4,2 milimoles) de H-25-31-OtBu son disueltos en 25 ml de DMF. La solución es enfriada a 0°C, y se le añaden 3,64 g (4,8 milimoles) de complejo de DCC-PPPOH, que contiene los reaccionantes en una proporción de 1:3. La mezcla de reacción es agitada a 0°C durante 20 minutos, y se continúa la agitación a la temperatura ambiente durante 5 horas. La mezcla es filtrada en 300 ml de éter anhidro, y el precipitado separado es luego sometido a filtración. Se obtienen 11,0 g (97%) de producto bruto, p. de f. 180°C. El producto bruto es disuelto en 33 ml de metanol, y se le precipita añadiendo 430 ml de acetado de etilo. Se obtienen 8,75 g (77%) de Z-15-31-OtBu. P. de f. 185°C (con descomposición), $R_f^3 = 0,5$.

15 Operación 14 : H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg-Arg-Iro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu.3HCl (H-15-31-OtBu.3HCl).

25 6,5 g (2,3 milimoles) de Z-15-31-OtBu son disueltos

414589

9 MAY 1973

en 85 ml de ácido acético, y se hace borbotear hidrógeno gaseoso dentro de la mezcla en presencia de 2 g de paladio sobre carbón. El avance de la reacción es vigilado mediante cromatografía en capa delgada. Cuando termina la reacción el catalizador es separado por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. Los 6,27 g de producto obtenidos son disueltos en 70 ml de agua, y la solución es acidificada a pH 4 con ácido clorhídrico diluido bajo enfriamiento. Después de esto se añaden a la mezcla ácida 20 ml de solución acuosa al 30% de NaCl, y el precipitado separado es sometido a filtración y secado. Con el fin de eliminar la sal inorgánica, el precipitado es suspendido en una mezcla de etanol y cloroformo, los productos insolubles son eliminados por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo es triturado con éter y filtrado. Se obtienen 5,35 g (85,6%) de H-15-31-OtBu.3HCl. $R_f^4 = 0,45$.

Operación 15: BOC-Ser-Tir-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu.3HCl (BOC-1-31-OtBu.3HCl).

2,96 g (1,5 milimoles) de BOC-Ser-Tir-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-OH (pa-

414589



tente británica número 1.201.053) y 4,08 g (1,5 milimoles) de H-15-31-OtBu. 3HCl son disueltos en 20 ml de DMF. La solución es enfriada a 0°C, y se le añaden ---
C, 21 ml de trietilamina seguido por 1,36 g (1,8 milimoles) de complejo de DCC-PPCH. La mezcla de reacción -
5 es mantenida a 0°C durante 10 minutos, después de esto es dejada reposar a la temperatura ambiente durante la noche. La mezcla es filtrada a través de 250 ml de ---
éter anhidro, y el precipitado separado es sometido a
10 filtración, lavado con éter y secado. Se obtienen 6,84 g (98,4%) de BCC-1-31-OtBu-3HCl; $R_f^4 = 0,45$.

Operación 16: H-Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-OH. $3CH_3COOH$
15 (H-1-31-OH. $3CH_3COOH$).

3,0 g (0,647 milimoles) de BCC-1-31-OtBu-3HCl son disueltos en 30 ml de una mezcla 8:1:1: de ácido trifluoroacético, agua y anisol, y la solución es agitada a la temperatura ambiente durante una hora. Después de
20 esto se añaden a la solución 300 ml de éter, el precipitado separado es filtrado y es lavado con éter. Los 2,89 g de trifluoroacetato obtenidos son disueltos en agua y la solución es hecha pasar a través de un intercambiador de aniones Dowex IX-8 (forma de acetato). El
25 fluido saliente es vertido sobre una columna que con-

414589



tiene 500 ml de CM 23, y la purificación se lleva a -
cabo mediante elución en gradiente. Las fracciones que
contienen el producto buscado son combinadas y secadas
por congelación. Se obtienen 1,64 g (70%) de H-1-31-OH.
5 El producto es cromatográficamente puro y posee su com-
pleta actividad biológica.

Análisis de aminoácidos: Lis 4,08 (4); His 1,0 (1);
Arg. 2,94 (3); Asp 2,01 (2); Met 0,78 (1); Ser 2,78 (3);
Glu 3,07 (3); Pro 2,86 (3); Gli 2,97 (3); Ala 1,09 (1);
10 Val 2,95 (3); Tir 2,1 (2); Phe 1,09 (1).

Ejemplo 2.

Método alternativo para la preparación de ACTH₁₋₃₁
humana.

Operación 1: Z-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-CPPF (Z-17-19-
15 -OPFP).

3,26 g (5 milimoles) de Z-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-OH
(patente británica número 1.201.053) son disueltos en -
30 ml de DMF, y se añaden a la solución 5,31 g (7 mili-
moles) de complejo de DCC-PFPOH. La mezcla de reacción
20 es agitada a la temperatura ambiente durante 5 horas, -
la DCU separada es eliminada por filtración, y el pro-
ducto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo
oleoso solidifica al almacenar bajo éter. El precipita-
do es separado por filtración y lavado con éter. Los -
25 3,8 g (92,9 %) de producto bruto obtenidos son disuel-

414589



tos en 11 ml de tetrahidrofurano, y son precipitados añadiendo a la solución 60 ml de éter. Se obtienen - 3,42 g (83,6 %) de Z-17-19-OPFP, $R_f^{16} = 0,55$.

Análisis para $C_{31}H_{36}O_{10}N_{11}F_5$ (817,9).

5 Calculado % : N. 18,8

Encontrado % : N. 18,6

Operación 2: Z-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-OH (Z-17-24-OH).

2,22 g (2,92 milimoles) de H-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-OH (patente británica número 1.201.053) son - suspendidos en 25 ml de DMF, y se añaden a la suspensión, con agitación, 2,64 g (3,22 milimoles) de Z-17-19-CPFP. Después de agitar durante 2,5 horas a la temperatura ambiente se forma una solución transparente. La solución - es agitada durante 2,5 horas adicionales, y después de - esto es evaporada hasta sequedad. Los 3,8 g (93,3 %) de producto bruto obtenidos son disueltos en 15 ml de metanol, y se añaden a la solución 100 ml de acetato de - etilo. El precipitado separado es filtrado y secado. Se obtienen 3,53 g (87,2%) de Z-17-24-OH; $R_f^4 = 0,7$.

Operación 3: H-Arg-Arg-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-OH.3HCl (H-17-24-OH.3HCl).

0,4 g (0,29 milimoles) de Z-17-24-OH son disueltos en 8 ml de ácido acético, y la mezcla es hidrogenada -- en presencia de 0,1 g de paladio sobre carbón. El avan-

414589



ce de la reacción es vigilado mediante cromatografía en capa delgada. Cuando termina la reacción, el catalizador es separado por filtración y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo oleoso es disuelto en 3 ml de metanol, y la solución es acidificada a pH. 4 con ácido clorhídrico diluido bajo enfriamiento. La solución ácida es evaporada hasta sequedad, y el residuo es triturado con acetato de etilo. Se obtienen 0,26 g (70,2%) de H-17-24-OH.3HCl, $R_f^4 = 0,1$.

Operación 4: Z-Lis(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-CH.2HCl (Z-16-24-OH.2HCl).

0,65 g (0,49 milimoles) de H-17-24-OH.3HCl son suspendidos en 7 ml de DMF, y se añaden a la suspensión 0,07 ml de trietilamina y 0,3 g (0,6 milimoles) de Z-Lis(BOC)-ONP. La mezcla de reacción es agitada a la temperatura ambiente durante 24 horas, y después de ello es evaporada hasta sequedad. El residuo es triturado con acetato de etilo, filtrado y lavado con una pequeña cantidad de agua. Se obtienen 0,6 g (76,3%) de Z-16-24-OH.2HCl; $R_f^4 = 0,45$.

Operación 5. Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-OH.2HCl (Z-15-24-OH.2HCl).

Una solución de 0,5 g (0,3 milimoles) de Z-16-24-OH.2HCl en 20 ml de metanol es hidrogenada en presen

414589



cia de paladio sobre carbón. Cuando la reacción está terminada, el catalizador es separado por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. - El residuo es triturado con acetato de etilo y filtra

5 do. Se obtienen 0,42 g (97,3%) de H-16-24-OH.2HCl; $R_f^4 = 0,15$. 0,33 g (0,23 milimoles) del producto obtenido son suspendidos en 3 ml de DMF, y se añaden a la suspensión 0,14 g (0,25 milimoles) de Z-Lis(BOC)-

10 -OPFP. Después de 10 minutos de agitación se forma una solución transparente. La solución es agitada durante 3 horas adicionales, y después de ello es evaporada hasta sequedad. El residuo es triturado con acetato de etilo. Se obtienen 0,36 g (85,4 %) de Z-15-24-

15 -OH.2HCl; $R_f^4 = 0,45$.

— Operación 6: Z-Lis(BOC)-Lis-(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-OtBu.2HCl (Z-15-31-OtBu.2HCl).

20 0,18 g (0,1 milimoles) de Z-15-24-OH.2HCl y 0,10 g (0,1 milimoles) de H-25-31-OtBu son disueltos en 1 ml de DMF, y se añaden a la solución 0,091 g (0,12 milimoles) de complejo de DCC-PFPOH. Después de 5 horas de agitación la mezcla de reacción es diluida con acetato de etilo, la DCU separada es eliminada por filtración,

25 y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El



414589

residuo es triturado con éter. Se obtienen 0,25 g (88,8%) de Z-15-31-OtBu.2HCl ($R_f^4 = 0,5$), que es tratado ulteriormente según se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

5 Síntesis de ACTH₁₋₃₂ humana.

Operación 1: Z-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu (Z-30-32-OtBu).

23,9 g (100 milimoles) de Z-Ser-OH y 14,5 g (100 milimoles) de H-Ala-OtBu son disueltos en 150 ml de cloruro de metileno. La solución es enfriada a -10°C, y se le añade de gota a gota una solución de 20,6 g (100 milimoles) de DCC
10 en 100 ml de cloruro de metileno. La mezcla de reacción es agitada a 0°C durante 2 horas, y después de esto es dejada reposar durante la noche. Al día siguiente la DCU se separa es filtrada, y el producto filtrado es lavado succe-
15 sivamente tres veces con 70 ml de ácido clorhídrico 1 N, tres veces con 70 ml de solución al 5% de NaHCO₃ y con agua. La fase orgánica es secada, se separa por destilación cloruro de metileno, y el residuo oleoso es tritu-
20 rado con n-hexano. Los 30,0 g (82%) de Z-Ser-Ala-OtBu ob-tenidos son disueltos en 600 ml de metanol, y la solu-
ción es hidrogenada en presencia de 2 g de paladio sobre carbón. El avance de la reacción es vigilado mediante -
cromatografía en capa delgada. Cuando termina la reacción, el catalizador es separado por filtración, el producto -
25 filtrado es evaporado hasta sequedad, y el residuo oleo-

414589



so es disuelto en 220 ml de acetato de etilo. 33,0 g (76 milimoles) de Z-Glu(OtBu)-ONSu son añadidos a la solución en acetato de etilo. Al día siguiente la solución es lavada sucesivamente tres veces con 50 ml de ácido clorhídrico 1 N, tres veces con 50 ml de solución al 5% de NaHCO₃ y con agua. La solución en acetato de etilo es secada, el disolvente es separado por destilación y el residuo oleoso es cristalizado en una mezcla de acetato de etilo y éter de petróleo. Se obtienen 31,5 g (75%) de Z-30-32-OtBu. P. de f. 72-74°C; $R_f^{11} = 0,6$; $[\alpha]_D = -28,9^\circ$.

Análisis para C₂₇H₄₁N₃O₉ (551,84);

Calculado % : C 58,8 H 7,5 N 7,7

Encontrado % : C 58,8 H 7,7 N 7,8

Operación 2: H-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu (H-30-32-OtBu).

16,0 g (29 milimoles) de Z-30-32-OtBu son disueltos en 350 ml de metanol, y la solución es hidrogenada en presencia de 1,6 g de paladio sobre carbón. Cuando termina la reacción, el catalizador es eliminado por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo es cristalizado en una mezcla de metanol y éter. Se obtienen 9,06 g (75%) de H-30-32-OtBu. P. de f. 135-136°C, $R_f^{11} = 0,15$, $[\alpha]_D = -25,9^\circ$ (c = 1, en etanol).

414589



Análisis para $C_{19}H_{35}N_3O_7$ (417,80):

Calculado % : C 54,6 H 8,5 N 10,1

Encontrado % : C 54,5 H 8,4 N 9,8

5 Operación 3: Z-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu
(Z-29-32-OtBu).

Una solución de 8,2 g (19,6 milimoles) de H-30-
-32-OtBu y 8,0 g (19,0 milimoles) de Z-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)
en 80 ml de acetato de etilo es hecha reaccionar duran
te la noche. Al día siguiente la solución es lavada --
10 sucesivamente tres veces con 20 ml de ácido clorhídri
co 1 N. tres veces con 20 ml de solución al 5% de --
NaHCO₃ y con agua. La solución en acetato de etilo es
secada, el disolvente es separado por destilación, el
residuo es triturado con éter de petróleo y filtrado.
15 Se obtienen 12,08 g (85,5%) de Z-29-32-OtBu. P. de f.:
85-87°C; $R_D^{11} = 0,55$; $[\alpha]_D^{20} = -32,8^\circ$ (c = 1, en --
etanol).

Análisis para $C_{35}H_{54}O_{12}N_4$ (722,81):

Calculado % : C 58,2 H 7,5 N 7,8

20 Encontrado % : C 58,3 H 7,6 N 7,3

Operación 4: H-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu
(H-29-32-OtBu).

Una solución de 10,5 g (14,5 milimoles) de Z-29-
32-OtBu en 130 ml de metanol es hidrogenada en presen
25 cia de 1 g de paladio sobre carbón. Cuando termina la
reacción, el catalizador es eliminado por filtración,



973

414589

y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo es triturado con éter de petróleo. Se obtienen 8,35 g (97,5%) de H-29-32-OtBu P. de f. 81-82°C; $R_f^{11} = 0,1$; $[\alpha]_D = -24,3^\circ$ (c = 1, en etanol).

5 Operación 5. Z-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu (Z-28-32-OtBu).

Una solución de 5,0 g (11,5 milimoles) de Z-Glu(OtBu)-CnSu y 6,6 g (11,2 milimoles) de H-29-32-OtBu en 100 ml de cloroformo es hecha reaccionar durante la noche. Al día siguiente la mezcla de reacción es lavada sucesivamente tres veces con 30 ml de ácido clorhídrico 1 N, tres veces con 30 ml de solución de NaHCO₃ y con agua. La solución en cloroformo es secada, el disolvente es separado por destilación, y el residuo es purificado por precipitación a partir de cloroformo con éter de petróleo. Se obtienen 8,45 g (83%) de Z-28-32-OtBu. P. de f. : 168-169°C. $R_f^{11} = 0,5$; $[\alpha]_D = -29^\circ$ (c = 1, en etanol).

Análisis para C₄₄H₆₉N₅O₁₅ (908,07)

20 Calculado % : C 58,2 H 7,7 N 7,7

Encontrado % : C 58,4 H 7,7 N 7,5

Operación 6: H-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu (H-28-32-OtBu).

Una solución de 8,0 g (8,8 milimoles) de Z-28-32-OtBu en 160 ml de metanol es hidrogenada en presencia

414589



de 1 g de paladio sobre carbón. Cuando termina la -
reacción, el catalizador es separado por filtración,
el producto filtrado es evaporado hasta sequedad, y
el residuo es triturado con éter y con éter de petró-
5 leo. Se obtienen 6,4 g (94%) de H-28-32-OtBu. P. de
f.: 138-139°C; $R_f^{12} = 0,1$; $[\alpha]_D = -9,7^\circ$ (c = 1,
en etanol).

Operación 7: Z-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-
-Ser-Ala-OtBu (Z-27-32-OtBu).

10 Una solución de 5,2 g (6,7 milimoles) de 5 H-28-
-32-OtBu y 2,15 g (6,7 milimoles) de Z-Ala-ONSu en -
50 ml de cloroformo es hecha reaccionar durante la no-
che. Al día siguiente la mezcla de reacción es lavada
sucesivamente tres veces con 10 ml de ácido clorhídri-
15 co 1 N, tres veces con 10 ml de solución al 5% de NaHCO₃
y con agua. La solución en cloroformo es secada, el di-
solvente es separado por destilación, el residuo es tri-
turado con éter de petróleo y filtrado. Se obtienen -
6,1 g (93,1%) de Z-27-32-OtBu. P. de f. 194-195°C;
20 $R_f^{12} = 0,5$; $[\alpha]_D = 30,9^\circ$ (c = 1, en etanol).

Análisis para C₄₇H₇₄O₁₆N₆ (979,14):

Calculado % : C 57,7 H 7,6 N 8,6

Encontrado % : C 57,6 H 7,7 N 8,5

Operación 8: H-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-
25 -Ser-Ala-OtBu (H-27-32-OtBu).

414589



Una solución de 6,1 g (6,2 milimoles) de Z-27-32-OtBu en 120 ml de metanol es hidrogenada en presencia de 1 g de paladio sobre carbón. Cuando termina la reacción, el catalizador es separado por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo es cristalizado en una mezcla de etanol y éter. Se obtienen 4,35 g (83%) de H-27-32-OtBu. P. de f.: 192-194°C; $R_f^{12} = 0,25$; $R_f = 0,1$.

Análisis para $C_{39}H_{68}N_6O_{14}$ (845,0):

10 Calculado % : C 55,4 H 8,1 N 9,9
Encontrado % : C 55,2 H 7,8 N 9,6

Operación 9: Z-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu (Z-25-32-OtBu).

2,45 g (13,3 milimoles) de pentafluorofenol, 1,31 g (4,02 milimoles) de Z-Asn-Gli-OH (véase Ejemplo 1) y 5,4 g (4,02 milimoles) de H-27-32-OtBu son disueltos en 24 ml. de DMF anhidro; después de esto la solución es enfriada a 0°C y se le añaden 0,915 g (4,43 milimoles) de DCC. La mezcla de reacción es agitada a 0°C durante 0,5 horas y a la temperatura ambiente durante 2,5 horas. La DCU separada es filtrada, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo sólido es triturado con acetato de etilo, filtrado y lavado con acetato de etilo caliente. Se obtienen 4,12 g (89%) de Z-25-32-OtBu. P. de f. 200-201°C. $R_f^3 = 0,6$;

414589



$[\alpha]_D = -13,9^{\circ}$ (c = 1, en DMF).

Operación 10: H-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-
-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu (H-25-32-OtBu).

Una solución de 4,0 g (3,48 milimoles) de Z-25-32-
5 -OtBu en 140 ml de metanol es hidrogenada en presencia
de 0,5 g de paladio sobre carbón. Cuando termina la -
reacción, el catalizador es separado por filtración,
el producto filtrado es evaporado hasta sequedad, el re
siduo es triturado con éter y separado por filtración.
10 Se obtienen 3,4 g (96%) de H-25-32-OtBu. P. de f. 188-
-190°C; $R_F^4 = 0,5$; $[\alpha]_D = -6,6^{\circ}$ (c = 0,89, en
DMF)..

Operación 11. Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg(NO₂)-Arg
(NO₂)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-Asn-Gli-Ala-
15 -Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu (Z-15-32-
-OtBu).

3,0 g (2,95 milimoles) de H-25-32-OtBu y 5,46 g -
(2,95 milimoles) de Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-
-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-OH (patente británica
20 número 1.201.053) son disueltos en 33 ml de DMF. La - -
solución es enfriada a 0°C, y se le añaden 3,35 g - - -
(4,42 milimoles) de complejo de DCC-PFPOH. La mezcla -
de reacción es mantenida a 0°C durante 15 minutos, y -
después de esto a la temperatura ambiente durante 6 -
25 horas. La DCU separada es filtrada, y el producto fil-

414589



trado es hecho pasar a través de 450 ml de éter anhi-
dro. El producto bruto separado es filtrado y purifi-
cado por precipitación con éter a partir de metanol.
Se obtienen 7,18 g (85,1 %) de Z-15-32-OtBu. $R_f^3 =$
5 0,35; $[\alpha]_D^{25} = -26,4^{\circ}$ (c = 0,42, en DMF).

Operación 12. H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg(NO₂)-Arg
(NO₂)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-Asn-Gli-Ala-
-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu.3HCl (H-
-15-32-OtBu.3HCl).

10 Una solución de 6,5 g (2,28 milimoles) de Z-15-32-
-OtBu en 85 ml de ácido acético es hidrogenada en pre-
sencia de 2 g de paladio sobre carbón. El avance de la
reacción es vigilado por cromatografía en capa delgada.
Cuando termina la reacción, el catalizador es separado
15 por filtración, el producto filtrado es evaporado hasta
sequedad, el residuo oleoso es triturado con éter anhi-
dro, y el producto sólido es separado por filtración.
Este producto es disuelto en 70 ml de agua, y la solu-
ción es acidificada a pH 4 con ácido clorhídrico dilui-
20 do. El producto es precipitado a partir de la solución
ácida añadiendo solución al 30% de NaCl. El precipita-
do es separado por filtración, y la sal inorgánica es
eliminada por precipitación desde una mezcla de meta-
nol y cloroformo. El disolvente es separado por desti-
25 lación, y el residuo es triturado con éter. Se obtienen

414589



5,6 g (89,6%) de H-15-32-OtBu-3HCl. $R_f^4 = 0,35$; $[\alpha]_D = -26,1^\circ$ (c = 1, en DMF).

Análisis de aminoácidos: Lis 3,0 (3); Arg 1,8 (2); Asp 1,98 (2); Ser 1,0 (1); Glu 2,2 (2); Pro 2,1 (2); -
5 Gli 1,05 (1); Ala 2,0 (2); Val 1,96 (2); Tir 0,96 (1).

Operación 13. BOC-Ser-Tir-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-OtBu.3HCl (BOC
10 1-32-OtBu-3HCl).

3,11 g (1,57 milimoles) de BOC-Ser-Tir-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-OH.HCl (patente británica número 1.201.253) y 4,30 g (1,57 milimoles) de H-15-32-OtBu son disueltos en 25 ml de DMF,
15 y se añaden a la solución 0,22 ml de trietilamina, seguido por 1,79 g (2,36 milimoles) de complejo de DCC-PPPOH. La mezcla de reacción es agitada durante 24 horas a la temperatura ambiente, después de esto es filtrada en 300 ml de éter anhidro. El producto separado
20 es filtrado y lavado. Se obtienen 7,2 g (98,5%) de BOC-1-32-OtBu-3HCl. $R_f^5 = 0,5$; $[\alpha]_D = -27,6^\circ$ (c = 1, en DMF).

Operación 14. H-Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala.3CH₃COOH
25

414589



(H-1-32-OH.3CH₃CCOH).

3,0 g (0,64 milimoles) de BOC-1-32-OtBu-3HCl son disueltos con agitación en una mezcla de 3,0 ml de anisól, 3,0 ml de agua y 24 ml de ácido trifluoroacético.

5 Después de agitar durante una hora, se vierten 300 ml de éter en la mezcla de reacción, el precipitado separado es filtrado y lavado con éter. Los 2,86 g de trifluoroacetato obtenidos son disueltos en agua, y hechos pasar a través de 100 ml de intercambiador de aniones

10 Dowex lx-8 (forma de acetato). El fluido saliente es -vertido sobre una columna de 500 ml de GM 23, y la purificación por cromatografía en columna se lleva a cabo mediante elución en gradiente. Las fracciones que -contienen el producto principal son combinadas y secadas

15 por congelación. Se obtienen 1,7 g (70%) de H-1-32-OH. El producto es cromatográficamente puro y posee -su completa actividad biológica.

Análisis de aminoácidos: Lis 3,94 (4); His 1,0 (1); Arg 2,81 (3); Asp 2,07 (2); Met 0,72 (1); Ser 2,72 (3);

20 Glu 2,94 (3); Pro 2,96 (3); Gli 2,89 (3); Ala 2,2 (1); Val 2,97 (3); Tir 1,98 (2); Phe 0,99 (1).

Ejemplo 4.

Síntesis de ACTH humana.

Operación 1: Z-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-

25 -Glu(OtBu)-Phe-OtBu (Z-31-39-OtBu).

414589

-9 MA



Una solución de 31,6 g (48,3 milimoles) de Z-Leu-
-Glu (OtBu)-Phe-OtBu (S. Bajusz, T. Lázár: Acta Chim.
Hung. 48, 111 /1966/) en 310 ml de DMF es hidrogena-
da en presencia de catalizador de paladio sobre carbón.
5 Cuando termina la reacción, el catalizador es separado
por filtración y el producto filtrado es evaporado has-
ta 100 ml. El concentrado es enfriado a -20°C.

38,5 g (47,4 milimoles) de Z-Ser-Ala-Glu(OtBu)-
-Ala-Phe-Pro-OH (véase patente británica número - - -
10 1.201.053) son disueltos en 100 ml de DMF anhidra y se
añaden a la solución 5,27 ml (47,4 milimoles) de N-me-
til-morfolina. Después de esto se añaden a la mezcla -
agitada, a -10°C, 6,26 ml (47,4 milimoles) de clorofo-
miato de isobutilo. La mezcla de reacción es agitada a
15 -10°C durante 8 minutos, luego es enfriada a -20°C, y
se le añade el concentrado previamente enfriado prepa-
rado tal como arriba se ha descrito. La mezcla de reac-
ción es agitada a -10°C durante 15 minutos y luego a
0°C durante una hora, y finalmente a la temperatura
20 ambiente durante una hora. La mezcla es vertida en 2
litros de agua helada que contienen 45 ml de N-metil-
-morfolina. El precipitado separado es filtrado, lava-
do con solución diluida de ácido cítrico, con agua y
finalmente con éter, y es secado. Se obtienen 55,85 g
25 (89,9%) de Z-31-39-OtBu. P. de f. 180°C (con descompo-



414589

sición), $R_f^5 = 0,7$.

Operación 2: H-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-Phe-OtBu (H-31-39-OtBu).

5 78,95 g (60,15 milimoles) de Z-31-39-OtBu son disueltos en 1500 ml de ácido acético al 80%, y la mezcla es hidrogenada en presencia de paladio sobre carbón. Cuando termina la reacción, el catalizador es separado por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo es triturado con éter
10 y filtrado. Se obtienen 74,35 g (99%) de H-31-39-OtBu. P. de f.: 105°C (con descomposición), $R_f^7 = 0,5$.

Operación 3. Z-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-Phe-OtBu (Z-30-39-OtBu).

15 44,5 g (85,8 milimoles) de sal de Z-Glu(OtBu)-OH. DCHA son suspendidos en 450 ml de DMF anhidra, y se añaden a la suspensión 9,6 ml (85,5 milimoles) de N-metil-morfolina. La solución obtenida es enfriada a -10°C, y se añaden gota a gota a la solución agitada 11,3 ml (85,8 milimoles) de cloroformiato de isobutilo.
20 La mezcla es enfriada a -20°C, y se vierte en ella una solución a -20°C de 88,5 g (71,5 milimoles) de H-31-39-OtBu en 300 ml de DMF anhidra. La mezcla de reacción es agitada a -10°C durante 15 minutos, a 0°C durante una hora y finalmente a la temperatura ambiente durante
25 una hora, y después de ello es vertida en 8 litros

414589



de solución 1 N de ácido cítrico. El precipitado separado es filtrado, lavado con agua y éter, y secado. Se obtienen 104,1 g (97,2%) de Z-30-39-OtBu. P. de f. 136-138°C (con descomposición, $R_f^5 = 0,8$).

5 Operación 4: H-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-Phe-OtBu (H-30-39-OtBu).

103,1 g (68,8 milimoles) de Z-30-39-OtBu son disueltos en 1500 ml de ácido acético al 80%, y la mezcla es hidrogenada en presencia de paladio sobre carbón. -
10 Cuando termina la reacción, el catalizador es separado por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo obtenido es triturado con éter, filtrado, y lavado con éter. Se obtienen 90,75 g (92,7%) de H-30-39-OtBu. P. de f.: 118°C (con descomposición),
15 $R_f^6 = 0,5$.

Operación 5: Z-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-Phe-OtBu (Z-29-39-OtBu).

38,3 g (75,9 milimoles) de sal de Z-Asp(OtBu)-OH₂ DCHA son suspendidos en 400 ml de DMF anhidra. Se añaden a la suspensión 8,5 ml (76,6 milimoles) de N-metil-morfolina, luego la mezcla obtenida es enfriada a -10°C y se añaden gota a gota a la mezcla agitada 10 ml (75,9 milimoles) de cloroformiato de isobutilo. La mezcla de reacción es enfriada a -20°C y se añade una solución a
25 -20°C de 90 g (63,25 milimoles) de H-30-39-OtBu en 250



414589

ml de DMF. La mezcla es agitada a -10°C durante 15 minutos, a 0°C durante una hora, y finalmente a la temperatura ambiente durante una hora. La sal separada es eliminada por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo es triturado con solución 1 N de ácido cítrico, el sólido es separado por filtración, y lavado a neutralidad. Se obtienen 98,5 g (93%) de Z-29-39-OtBu. P. de f.: 185°C (con descomposición), $R_{\text{F}}^5 = 0,8$.

10 Operación 6: H-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-Phe-OtBu (H-29-39-OtBu).

67,25 g (42,15 milimoles) de Z-29-39-OtBu son disueltos en 1300 ml de ácido acético al 80%, y la mezcla es hidrogenada en presencia de paladio sobre carbón. Al final de la reacción el catalizador es separado por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo es triturado con éter, el sólido es separado por filtración y secado. Se obtienen 63,8 g (95%) de H-29-39-OtBu. P. de f.: $128-132^{\circ}\text{C}$ (con descomposición); $R_{\text{F}}^5 = 0,3$.

20 Operación 7: Z-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-Phe-OtBu (Z-28-39-OtBu).

25 27,3 g (52,55 milimoles) de sal de Z-Glu(OtBu)-OH.



414589

DCHA son suspendidos en 270 ml de DMF anhidro, y se añaden a la suspensión 5,9 ml (53,2 milimoles) de N-metil-porforina. La mezcla es enfriada a -10°C , y se añaden gota a gota a la mezcla agitada 6,95 ml (52,55 milimoles) de cloroformiato de insobutilo. Después de agitar durante 8 minutos, la mezcla es enfriada a -20°C , y se le añade una solución a -20°C de 69,9 g (43,8 milimoles) de H-29-39-OtBu en 270 ml de DMF. La mezcla es mantenida a -10°C durante 15 minutos, a 0°C durante una hora, y finalmente a la temperatura ambiente durante una hora. La sal separada es eliminada por filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta sequedad. El residuo es triturado con solución 1 N de ácido cítrico, filtrado y lavado a neutralidad. Se obtienen 70,15 g (86,2%) de Z-28-39-OtBu. P. de f. 205°C (con descomposición), $R_f^{13} = 0,9$.

Operación 8. Z-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-Phe-OtBu (Z-27-39-OtBu).

69,0 g (37,2 milimoles) de Z-28-39-OtBu son disueltos en 1800 ml de DMF anhidra, y la mezcla es hidrogenada en presencia de paladio sobre carbón. Al final de la reacción, el catalizador es eliminado por filtración, y el producto filtrado es concentrado hasta un volumen final de 300 ml. El concentrado es agitado, y se le añaden 20,2 g (42,85 milimoles) de Z-Ala-OPCP, seguido por



414589

la adición en porciones de 4,76 ml (42,85 milimoles) de N-metil-morfolina. Al día siguiente la mezcla gelificada y espesa es vertida en 4 litros de solución al 5% de NaHCO_3 con agitación y enfriamiento. El sólido separado es filtrado y lavado hasta neutralidad. El producto bruto es disuelto en 1900 ml de metanol caliente, y el producto es precipitado a partir de la solución añadiendo 1100 ml de agua. La mezcla es dejada reposar durante la noche, después de esto el sólido separado es filtrado, lavado y secado. Se obtienen 59,2 g (82,6%) de Z-27-39-OtBu. P. de f.: 210°C ; $R_f^{12} = 0,7$.

Operación 9: H-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-Phe-OtBu (H 27-39-OtBu).

8,5 g (4,41 milimoles) de Z-27-39-OtBu son disueltos en 850 ml de DMF anhidra, y la mezcla es hidrogenada en presencia de paladio sobre carbón. Al final de la reacción, el catalizador es eliminado por filtración, el producto filtrado es evaporado hasta sequedad, y el residuo es triturado con éter. Se obtienen 7,65 g (96,9%) de H-27-39-OtBu. P. de f. 197°C (con descomposición). $R_f^{12} = 0,3$.

Operación 10. Z-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-

414589



-Phe-OtBu (Z-25-39-OtBu).

3,58 g (2,0 milimoles) de H-27-39-OtBu y 0,65 g (2,0 milimoles) de Z-Asn-Gli-OH (véase Ejemplo 1) son disueltos en 30 ml de DMF anhidra. La solución es en-
5 friada a 0°C y se le añaden 1,8 g (2,4 milimoles) de complejo de DCC-PFPOH. Después de agitar durante 4 ho-
ras la mezcla es filtrada en 300 ml de éter, el preci-
pitado separado es recogido por filtración, y lavado
con éter. Se obtienen 3,7 g (88%) de Z-25-39-OtBu. P.
10 de f.: 194°C (con descomposición); $R_f^{12} = 0,3$.

Operación 11. H-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-
-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-
-Phe-OtBu.HCl (H-25-39-OtBu.HCl).

3,92 g (1,87 milimoles) de Z-25-39-OtBu son disuel-
15 tos en 400 ml de ácido acético al 80%, y la mezcla es
hidrogenada en presencia de paladio sobre carbón. Al -
final de la reacción, el catalizador es separado por -
filtración, y el producto filtrado es evaporado hasta
sequedad. El residuo es disuelto en DMF anhidra, y se
20 añade a la solución piridina que contiene 6 a 8 equiva-
lentes de ácido clorhídrico. El disolvente es separado
por destilación, el residuo oleoso es triturado con --
agua, los sólidos son separados por filtración, lava-
dos con agua y acetato de etilo, y secados. Se obtienen
25 3,22 g (86,1%) de H-25-39-OtBu.HCl . P. de f.: 187°C

414589



(con descomposición), $R_f^{13} = 0,3$.

Operación 12. Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg(NO₂)-Arg
(NO₂)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-Asn-Gli-Ala-
-Glu(OtBu)-Asp(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-
5 -Phe-Pro-Leu-Glu(OtBu)-Phe-OtBu (Z-15-39-OtBu).

3,0 g (1,5 milimoles) de H-25-39-OtBu.HCl y 3,1
g (1,65 milimoles) de Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg(NO₂)-
-Arg(NO₂)-Pro-Val-Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-OH (véa-
se patente británica Nº 1.201.053) son disueltos en
10 20 ml de DMF anhidra. La solución es enfriada a 0°C,
y se le añaden 0,166 ml (1,5 milimoles) de N-metil-
-morfolina, seguido por 1,4 g de complejo de DCC-PFPGH.
La mezcla de reacción es agitada a la temperatura ambien-
te durante 24 horas y después de esto es filtrada en -
15 400 ml de éter. El precipitado separado es filtrado,
suspendido en acetona, agitado, y filtrado de nuevo. -
Se obtienen 5,15 g (90%) de Z-15-39-OtBu. P. de f.: -
220°C (con descomposición); $R_f^{12} = 0,2$; $R_f^6 = 0,65$.

Operación 13. H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Arg-Arg-Pro-Val-
20 -Lis(BOC)-Val-Tir(tBu)-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu(OtBu)-Asp
(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-Ala-Glu(OtBu)-Ala-Phe-Pro-Leu-
-Glu(OtBu)-Phe-OtBu.3HCl (H-15-39-OtBu.3HCl).

5,0 g (1,31 milimoles) de Z-15-39-OtBu son disuel-
tos en 100 ml de ácido acético al 80%. Se añaden a la
25 solución 3 g de polvo de zinc activado, y la suspen-



414589

sión obtenida es agitada a la temperatura ambiente. El avance de la reducción es vigilado por cromatografía en capa delgada. Al final de la reducción la suspensión es filtrada, el producto filtrado es evaporado, el residuo es triturado con agua y los sólidos son separados por filtración. El producto es disuelto en 300 ml de ácido acético al 80%, y la mezcla es hidrogenada en presencia de paladio sobre carbón. Al final de la reacción el catalizador es separado por filtración, la solución es evaporada hasta sequedad, y el residuo es triturado con éter. Los sólidos son separados por filtración, disueltos en 40 ml de piridina, y se añaden a la solución, con enfriamiento, 10 ml de piridina que contiene 1,5 ml de ácido clorhídrico concentrado. La solución obtenida es evaporada, el residuo es triturado con agua, los sólidos son separados por filtración y lavados con agua. Se obtienen 4,0 g (85%) de H-15-39-OtBu-3HCl. P. de f. 208°C (con descomposición); $R_f^7 = 0,35$.

Operación 14: H-Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH (H-1-39-OH).

3,6 g (1,0 milimoles) de H-15-39-OtBu-3HCl y 2,0 g (1 milimol) de BOC-Ser-Tir-Ser-Met-Glu(OtBu)-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-OH.HCl (véase patente

9 MAY 1973

414589

5 británica número 1.201.053) son disueltos en 20 ml de DMF. La solución es enfriada a 0°C, y se añaden a la misma 0,11 ml (1 milimol) de N-metil-morfolina y 0,95 g de complejo de DCC-PPOH. La mezcla de reacción es agitada a la temperatura ambiente durante 24 horas, y después de ello es filtrada en 200 ml de éter. El producto separado (5,6 g, $R_f^7 = 0,55$) es filtrado y lavado con éter y agua.

10 1 g del compuesto anterior es disuelto en una mezcla de 20 ml de ácido trifluoroacético y 1 ml de mercaptoetanol. La solución es dejada reposar a la temperatura ambiente durante una hora, y después de esto es evaporada en vacío. El residuo es disuelto en 20 ml de agua, y la solución obtenida es evaporada de nuevo en vacío. El residuo es disuelto en 10 ml de agua, y los iones trifluoroacetato son reemplazados por iones acetato utilizando un intercambiador de iones Amberlite IRA 410 (forma de acetato). La solución obtenida es secada por congelación, y el producto bruto es purificado utilizando una columna de intercambiador de iones CM-32. En calidad de agentes eluyentes se utilizan soluciones; respectivamente, 0,13 molares (pH 6,6) y 0,25 molares (pH = 7) de acetato de amonio. Las fracciones que contienen el producto buscado son combinadas y secadas por congelación.

15

20

25



414589

Se obtienen 0,6 g (60%) de H-1-39-OH. $R_f^{14} = 0,25$.

Análisis de aminoácidos : Asp 1,9 (2); Ser 2,7 (3);
Glu 4,7 (5); Pro 3,8 (4); Gli 3,0 (3); Ala 3,0 (3); Leu
1,0 (1); Val 2,9 (3); Met 0,95 (1); Tir 1,9 (2); Phe 3,0
5 (3); His 0,95 (1); Lis 3,8 (4); Arg 2,8 (3). Tir:Trp =
2,1 (2,0).

Esta solicitud que corresponde a la presentada en
Hungría, el día 15 de Mayo de 1972, bajo el Nº RI-465,
se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente -
10 Estatuto sobre Propiedad Industrial.

15

REIVINDICACIONES

20

Los puntos de invención propia y nueva que se pre-
sentan para que sean objeto de esta solicitud de Paten-
25 te de Invención en España, por VEINTE años, son los que



414589

se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Un procedimiento para la preparación de poli péptidos biológicamente activos que contienen el grupo aspartilo, particularmente un resto aspartil-glicina, por copulación de los correspondientes componentes de péptido bloqueados utilizando la técnica del éster activo y eliminando subsiguientemente los grupos bloqueadores, caracterizado porque el grupo carboxi del componente acilante es activado convirtiéndolo en el éster pentafluorofenílico a la temperatura ambiente o a temperaturas más bajas, preferiblemente a una temperatura de alrededor de 0°C, la acilación se lleva a cabo a la temperatura ambiente o a temperaturas más bajas, preferiblemente con cantidades equimolares de los respectivos reaccionantes y, si se desea, los péptidos libres obtenidos después de eliminar los grupos bloqueadores son convertidos en sus sales por adición de ácido o complejos o condensados farmacéuticamente aceptables.

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª para la preparación de péptidos que tienen la fórmula general (I)

Ser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-Lis-Val-Tir-Pro-Asn-Gli-Ala-Glu-Asp-Glu-Q (I) y de los derivados protegidos de dichos compuestos, en donde Q puede representar



414589

el grupo: (a) Ser-OH; (b) Ser-Ala-OH; (c) Ser-Ala-Glu-
-OH; (d) Ser-Ala-Glu-Ala-OH; (e) Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-
-OH; (f) Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-OH; (g) Ser-Ala-Glu-
-Ala-Phe-Pro-Leu-OH; (h) Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-
5 -Glu-OH; ó (i) Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH;
caracterizado porque el grupo carboxi del componente
acilante es activado convirtiéndolo en el éster penta-
fluorofenílico en la reacción de copulación llevada a
cabo con péptidos bloqueados que contienen un grupo -
10 aspartilo o un resto de aspartil-glicina.

3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
en que el éster pentafluorofenílico del componente de
péptido acilante es separado de la mezcla de reacción
y subsiguientemente es hecho reaccionar con el compo-
15 nente que ha de ser acilado.

4ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
para la acilación de componentes que no contienen gru-
pos carbóxi libres, en que el éster pentafluorofeníli-
co es preparado directamente en el medio de reacción.

20 5ª.- Un procedimiento según una cualquiera de las
reivindicaciones 1ª a 4ª, en que se añaden separadamen-
te a la mezcla de reacción pentafluorofenol y dicitclo-
hexilcarbodiimida.

25 6ª.- Un procedimiento según una cualquiera de las
reivindicaciones 1ª a 4ª, en que se añade a la mezcla

MM

414589



de reacción un complejo de pentafluorofenol y dicitclo
hexilcarbodiimida.

5 7ª.- Un procedimiento según una cualquiera de
las reivindicaciones 1ª a 6ª, en que el resto de aspar
til-glicina es utilizado en toda la síntesis en la for
ma de la carboxamida libre.

8ª.- Un procedimiento según una cualquiera de
las reivindicaciones 1ª a 6ª, en que el resto de aspartil
-glicina es formado a una temperatura de 0 a 4°C.

10 9ª.- Un procedimiento según una cualquiera de
las reivindicaciones 1ª a 6ª, en que péptidos que con
tienen un radical aspartilo con grupo carboxi libre son
acilados con un éster pentafluorofenílico previamente
formado del tripéptido Z-Arg(NO₂)-Arg(NO₂)-Pro-OH.

15 10ª.- Un procedimiento para la preparación de
polipéptidos biológicamente activos.

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

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

16 JUL. 1974

Madrid,

P.A.

Alberto de Eizaburu
Per/Polim

25

5.7.74

- 54 -