



410510

Int. Cl. 2: C07C//A61K

PATENTE  
DE  
INVENCIÓN

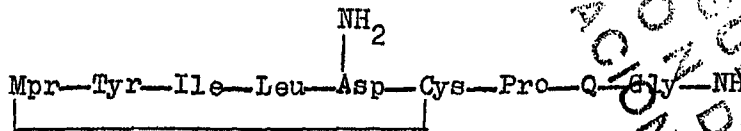
por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NONAPEPTIDOS",  
a favor de la firma suiza F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, S.A.,  
residente en BASILEA (Suiza).

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a nonapéptidos y a  
un procedimiento para su preparación.

Los nonapéptidos proporcionados por el presente in-  
vento son compuestos de la fórmula general

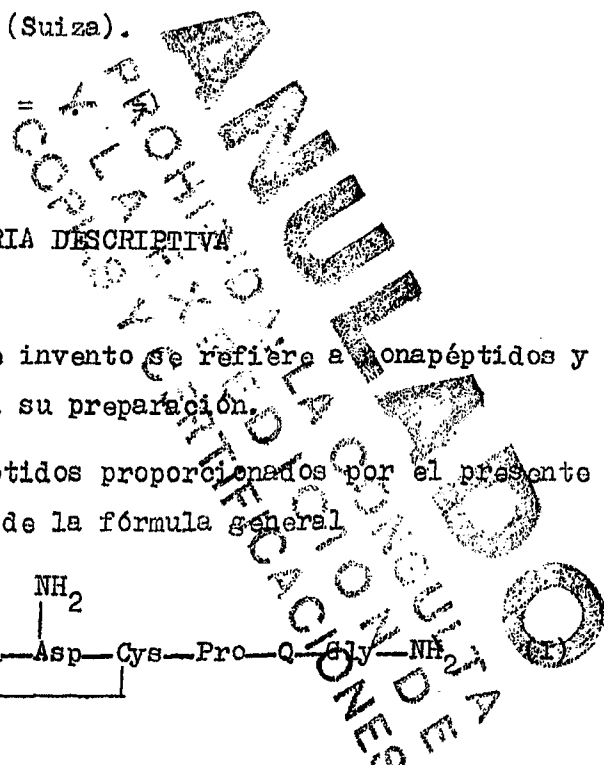
5.



en la que

10.

Q significa el radical de la arginina o de la lisina,

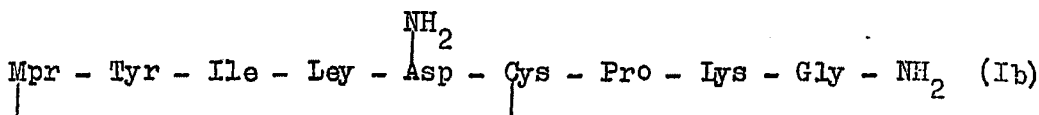
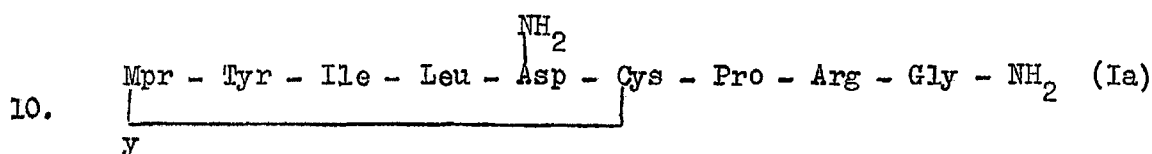




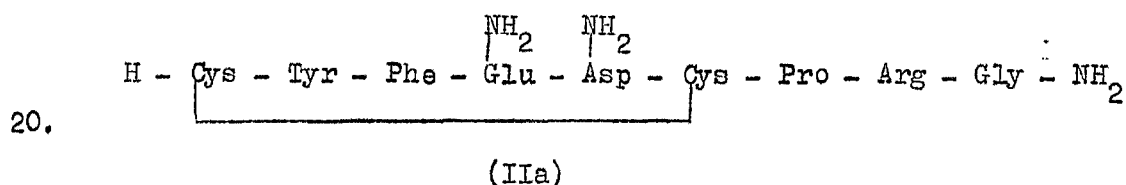
Mpr significa el grupo beta-mercaptopropionílico y todos los aminoácidos con un átomo de carbono asimétrico presentan la configuración L, y sus sales de adición de ácido atóxicas y farmacéuticamente utilizables.

5.

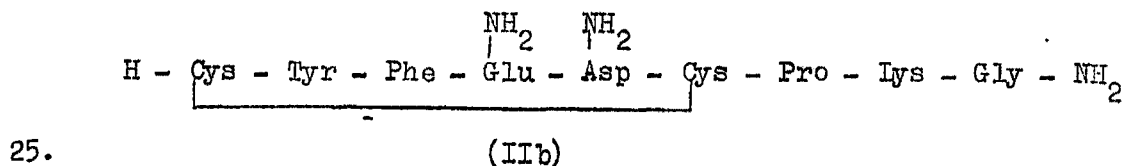
Los compuestos de la fórmula I, que también pueden representarse por las fórmulas



son análogos de las hormonas neurohipofisarias existentes en forma natural; por ejemplo, la arginin- o lisinvasopresinas de las fórmulas



y



Los compuestos proporcionados por el presente invento se distinguen de las vasopresinas existentes de forma natural en que los aminoácidos cisteína, fenilalanina y glutamina están reemplazados por ácido beta-mercaptopropiónico, isoleucina y leucina. Así pues, se les puede designar como deamino<sup>1</sup>-[Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>]-argininvasopresina o deamino<sup>1</sup>-[Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>]-lisinvasopresina.

30.

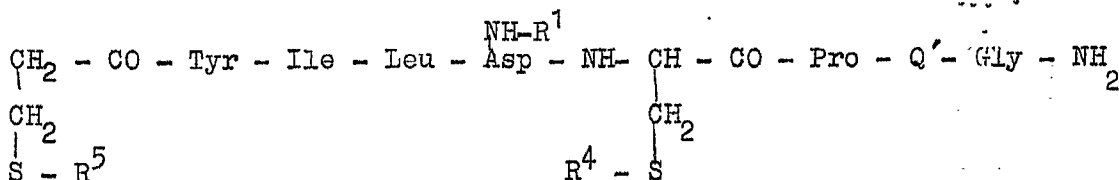






con disociación simultánea o preliminar de cualquier grupo protector que pueda estar presente y convirtiendo el producto obtenido, si se desea, por reacción con un ácido orgánico o inorgánico, en una sal de adición de ácido atóxica y farmacéu- ticamente utilizable,

5. o bien  
c) oxidando un péptido de la fórmula general



10. en la que  
 $R^1$  significa un átomo de hidrógeno o un grupo protector amídico,  
 $Q'$  significa una agrupación de la fórmula  
 $-\text{NH}-\text{CH} \begin{array}{l} / \\ \backslash \end{array} - (\text{CH}_2)_3 - \text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NHR}^2-\text{CO}-$  o  
 $-\text{NH}-\text{CH} \begin{array}{l} / \\ \backslash \end{array} - (\text{CH}_2)_4 - \text{NH}-\text{R}^3-\text{CO}-$  en donde  
 $R^2$  significa un átomo de hidrógeno o un grupo protector del radical guanidínico y  
 $R^3$  significa un átomo de hidrógeno o un grupo protector del grupo épsilon-amínico de la li-  
 15. sina, siempre que por lo menos uno de los ra-  
 20. dicales  
 $R^1$  y  $R^2$  o  $R^3$  represente un grupo protector y  
 $R^4$  y  $R^5$  representan cada uno un átomo de hidrógeno o  
 25. un grupo protector sulfidrílico y en donde  
 todos los aminoácidos con un átomo de carbono  
 asimétrico presentan configuración L,  
 con disociación simultánea del grupo o los grupos protectores,  
 y convirtiendo el producto obtenido, si se desea, por reacción  
 con un ácido orgánico o inorgánico, en una sal de adición de  
 30. ácido atóxica y farmacéuticamente utilizable,







para los grupos protectores individuales.

La amidación de un péptido de la fórmula VI, y en particular de uno en el que Q denote el radical de la arginina, puede realizarse de manera ya conocida, preferentemente por reacción cuidadosa con amoníaco acuoso del éster activado, a la temperatura del ambiente.

5.

Los grupos protectores a que se hace referencia en esta descripción puede ser cualquier grupo protector conocido en la química de los péptidos.

10.

Ejemplos de grupos protectores amínicos son los del tipo del acilo (como formilo, benzoílo, ftalilo, trifluoroacetilo, p-tosilo, aril- y alquifosforilo, fenil- y bencil-sulfonilo, tritilsulfenilo, o-nitrofenilsulfenilo, gamma-clo-robutirilo y o-nitrofenoxiacetilo), del tipo del alquilo (como tritilo, bencilo y alquilideno) o del tipo del uretano (como carbobenzoxilo, p-tromo-, p-cloro- o p-metoxi-carbobenzoxilo, tosiloxi-, aliloxi-, ciclopentiloxi-, ciclohexiloxi-, terci-butiloxi- o 1,1-dimetilpropiloxi-, 2-(p-bifenilil)-2-propiloxi-carbonilo y benciltiocarbonilo). Los grupos amínicos pueden protegerse además por protonación. Ejemplos de grupos protectores amídicos son xantenilo, 2,4-dimetoxibencilo, 2,4,6,-trimetoxibencilo y 4,4'-dimetoxibenzidrilo.

15.

20.

25.

Los grupos protectores especiales para el radical arginínico incluyen, por ejemplo, p-tosilo, carbobenzoxilo, p-nitrocarbobenzoxilo, terci-butoxi-, adamantiloxi- e isoborniloxi-carbonilo. El radical arginínico puede además protegerse mediante protonación o nitración.

30.

Ejemplos de grupos protectores sulfidrílicos son los grupos de alquiltio o ariltio, como etiltio, terci-butiltio y feniltio; los grupos de alquilo y de alquilo substituido, como butilo terciario, 2-dietoxicarbonil-etilo, bencilo, tritilo, p-metoxibencilo, p-nitrobencilo, 4-picolilo, bencil-



tiometilo, acetamidometilo e isobutiloximetilo; y los grupos de acilo, como carbobenzoilo, benzoilo, acetilo, p-metoxiben-  
ciloxicarbonilo y etilaminocarbonilo o tetrahidropiran-2-ilo.

5. Los materiales de partida de las fórmulas III, IV, V, VI, VII, IX y XI antes expuestas son nuevos y deberá entenderse que constituyen igualmente objeto del presente invento.

La preparación de los materiales de partida puede realizarse de manera ya conocida, con empleo de los grupos protectores usuales, en especial de los que se han citados antes.

10. Ejemplos de grupos protectores carboxílicos son los O- y S-ésteres (por ejemplo, los ésteres de metilo, etilo, terci-butilo, bencilo, cianometilo, ftalimidometilo, 4-picolilo 2-p-tosiletilo, fenilo, p-nitrofenilo, tiofenilo o p-nitroben-  
cilo), las amidas y las hidracidas (por ejemplo las hidracidas de tritilo, fenilo, carbobenzoilo y terci-butoxicarbonilo).

15. Además, el grupo carboxílico puede ser protegido por formación de sal.

20. Ejemplos de grupos carboxílicos activados son los ésteres, como los ésteres y las acidas de cianometilo, p-cia-  
nofenilo, p-nitrofenilo, 2,4,5-triclorofenilo, tiofenilo, p-  
nitrotiofenilo, 1-benzotriazolilo, ftalimidilo, 1-succinimi-  
dilo, 1-piperidilo, 8-quinolilo, 5-cloro-8-quinolilo, 2-piri-  
dilo y 2-tiopiridilo.

25. Un péptido de la fórmula IV o V puede prepararse, por ejemplo, mediante prolongación sucesiva de la cadena de un dipéptido con una unidad de aminoácido o bien a partir de dos o más unidades básicas. Mediante oxidación de manera conocida puede convertirse un péptido de la fórmula V en un péptido de la fórmula III. Un péptido de la fórmula III puede prepararse también por ejemplo, mediante reacción de un compuesto  
30. de la fórmula general.





se, por ejemplo, mediante reacción de un hexapéptido de la fórmula VII con un compuesto de la fórmula  $\text{Pro-R}^6$  o  $\text{Pro-Q-R}^6$ , en donde Q y  $\text{R}^6$  tienen el significado indicado antes.

5. La preparación de los compuestos de la fórmula I, según la modalidad (d) o (e) del procedimiento de este invento es apropiada especialmente para la serie de los análogos de la argininovasopresina.

10. Los nonapéptidos proporcionados por este invento tienen actividad hormonal, cualitativamente semejante a la de las hormonas neurohipofisarias. Cabe destacar especialmente la intensa actividad natriurética. Estos nonapéptidos son superiores, no solo con relación a la intensidad de la acción sino también con relación a la duración de ésta, a la argininovasotocina natural ( $[\text{Ile}^3]$ -argininovasopresina) y a la  
15.  $[\text{Leu}^4]$ -oxitocina preparada por V.J. Hruby y col. [J. Biol. Chem. 244, 3890 (1969)], un análogo hormonal, neurohipofisario que presenta la mayor actividad natriurética hasta ahora conocida. La acción hipertensora de los nonapéptidos de este invento es menor que la de la argininovasotocina, por lo que  
20. la actividad natriurética de estos nonapéptidos está acrecentada selectivamente con respecto a la actividad hipertensora.

25. En virtud de las actividades biológicas que se han indicado, los nonapéptidos proporcionados por el presente invento se prestan para el tratamiento de edemas de diversa naturaleza y de los trastornos generales del metabolismo electrolítico, especialmente los de la retención de sodio.

30. La dosificación de los presentes nonapéptidos debe regularse según las exigencias individuales y puede variar entre 100 microgramos y 10 miligramos para cada dosis, administrada una o varias veces al día.

Los nonapéptidos pueden administrarse en forma de las bases libres o como sales de adición de ácido atóxicas y



5. farmacéuticamente utilizables con ácidos orgánicos o inorgánicos o bien con polímeros que contengan grupos de ácido (como, por ejemplo, la carboximetilcelulosa o el ácido tánico). Pueden administrarse solos o en forma de preparaciones farmacéuticas idóneas, por ejemplo, para administración oral, parenteral, enteral o intranasal.

10. Para componer las preparaciones medicinales, los nonapéptidos proporcionados por este invento pueden mezclarse con materias coadyuvantes inorgánicas u orgánicas que sean inertes y fisiológicamente aceptables. Así pues, se apreciará que el presente invento incluye, asimismo, dentro de su alcance una preparación farmacéutica que contiene un nonapéptido, como se ha definido anteriormente, asociado con un vehículo farmacéutico compatible.

15. La extraordinaria estabilidad metabólica de estos nonapéptidos (o sea, de los análogos de la vasopresina), los hace particularmente aptos para la administración subcutánea o pernasal.

20. Los ejemplos siguientes ilustran el procedimiento que proporciona el presente invento.

EJEMPLO 1

- a) Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida.

25. Se disolvieron en 100 cc de ácido acético glacial 18,0 g de Z-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida (preparada según R.L. Huguenin y R.A. Boissonnas, Helv. 49, 695 - 1966) y se mezcló la solución con 100 cc de una solución 5 N de bromuro de hidrógeno/ácido acético glacial. Se agitó la mezcla durante 45 minutos
30. a la temperatura del ambiente y a continuación se la instiló en 1 litro de éter. El bromhidrato de pentapéptido precipitado se lavó con éter, se secó sobre hidróxido potásico y pentóxido



de fósforo y se disolvió en 100 cc de metanol. Se pasó la solución a través de una columna de Dowex 2 (forma OH<sup>-</sup>), se concentró el eluato bajo presión reducida y se disolvió el residuo en 100 cc de dimetilformamida. Se mezcló la solución, a 5. 0°C, con 8,5 g de Z-L-Leu-OPhNO<sub>2</sub>, se guardó la mezcla a la temperatura del ambiente durante 3 días, se precipitó por adición de 1 litro de acetato de etilo el hexapéptido protegido, se le lavó con éter y con acetato de etilo y se le secó. Rendimiento: 16,3 g; punto de fusión: 183-185°C; [alfa]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -41,6° (c = 0,5 en dimetilformamida).

10.

b) Z-L-Isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida

De 16,0 g de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida se disoció de la manera que se ha descrito en a) el grupo protector Z y la amina libre obtenida se hizo reaccionar con 6,0 g de Z-L-Ile-OPhNO<sub>2</sub> en 100 cc de dimetilformamida. Se guardó la mezcla a la temperatura del ambiente durante 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; [alfa]<sub>D</sub><sup>25</sup> = - 41,9° (c = 0,5 en dimetilformamida).

15.

20.

25.

c) Z-O-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida.

De 10,0 g de la Z-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida se disoció de la manera que se ha descrito en a) el grupo protector Z y la amina libre resultante se hizo reaccionar con 4,5 g de Z-O-bencil-L-Tir-OPhNO<sub>2</sub> en 100 cc de dimetilformamida. Después de 3 horas de reposo a la temperatura del ambiente, se precipitó por adición de acetato de etilo el octapéptido protegido, se le lavó con acetato de etilo y con etanol,

30.



se le reprecipitó de ácido acético glacial/etanol, se le lavó con etanol y se le secó. Rendimiento: 8,4 g; punto de fusión 237-238°C;  $[\alpha]_D^{24} = -36,2^\circ$  (c = 0,5 en dimetilformamida).

5. d) Beta-benciltiopropionil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida.

10. Se disolvieron en 50 cc de ácido acético glacial 7,0 g de Z-0-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginilglicinamida y se mezcló la solución con 50 cc de una solución 5N de bromuro de hidrógeno/ácido acético glacial. Después de una hora de agitación, se instiló la mezcla en 1 litro de éter, se separó por filtración el precipitado, se le lavó con éter, se le reprecipitó de etanol/éter y se le secó sobre pentóxido de fósforo e hidróxido potásico.
15. Se disolvieron en 10 cc de dimetilformamida 0,5 g del bromhidrato así obtenido. Se ajustó la solución a pH 7 por adición de etil-diisopropilamina y se la mezcló a 0°C con 0,2 g de éster p-nitrofenílico de ácido beta-benciltiopropiónico y unas pocas gotas de ácido acético glacial.
20. Después de un día de reposo a la temperatura del ambiente, se precipitó por adición de etanol el péptido protegido, se le lavó con etanol y se le secó. Se disolvió este residuo en un poco de dimetilformamida, se le volvió a precipitar por adición de agua, se le lavó con etanol y se le secó. Rendimiento, 0,4 g; punto de fusión 224-226°C;  $[\alpha]_D^{25} = -36,6^\circ$  (c = 0,5 en dimetilformamida).
- 25.

- e) Diacetato de deamino<sup>1</sup>-(Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>)-argininovasopresina.

30. Se redujeron con sodio en 300 cc de amoníaco líquido 300 mg de beta-benciltiopropionil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida. Después de excluir el amoníaco, se disolvió el residuo en 900 cc de agua que contenía unas pocas



- gotas de ácido acético glacial y se ajustó la solución con hidróxido sódico a pH de 6,8. Luego se añadieron 45 cc de una solución 0,01 molar de  $K_3[Fe(CN)_6]$ , mientras se mantenía el pH a 6,5-7,0 por adición de hidróxido sódico. Se guardó la
5. mezcla reaccional a la temperatura del ambiente durante 15 horas y se la pasó a través de una columna de Amberlite IR-45 (forma  $Cl^-$ ). Se acidificó el eluato con ácido acético, se le concentró hasta unos 40 cc bajo presión reducida y se le mezcló a gotas con una mezcla de 1-butanol/benceno/piridina
10. (6:2:1) hasta que empezó a segregarse una segunda fase. Se aplicó entonces la solución a una columna de Sephadex G-25, superfino, que se equilibró con la fase inferior del sistema de distribución 1-butanol/benceno/piridina/ácido acético 0,2 N (6:2:1:7), y se reveló con la fase superior de este sistema. La distribución se determinó por el método de Folin-Lowry
15. (O.H. Lowry y col., J. Biol. Chem. 193, 265 - 1951 -). Se combinaron las fracciones centrales del tipo principal, se diluyeron con agua, se concentraron bajo presión reducida y por último se liofilizaron (rendimiento: 121 mg). Para purificarlo todavía mas, se sometió este material a una segunda cromatografía de distribución en el mismo sistema. La deamino<sup>1</sup>-(Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>)-argininovasopresina purificada (rendimiento: 90 mg) tiene en este sistema un índice Rf de 0,27;  $[\alpha]_D^{25} = -85,52$  (c = 0,5 en ácido acético 1N).
20. Electroforesis de papel:
- Tampón a base de 2 cc de ácido acético glacial y 20 cc de piridina, completado con agua hasta 1 litro (pH = 6,0):  
Rf (arginina) =  $0,30 \pm 0,05$ .
- Tampón a base de 37 cc de ácido fórmico y 5 cc de ácido acético, completado con agua hasta 1 litro (pH = 1,7):
30. Rf (arginina) =  $0,25 \pm 0,05$ .



- La diamino<sup>1</sup>-(Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>)-argininovasopresina puede purificarse también procediendo, después de excluir los iones de ferricianuro y ferrocianuro, por medio de Amberlite IR-45 (forma Cl<sup>-</sup>), a acidificar el eluato, absorberlo en
5. Amberlite CG-50 (forma H<sup>+</sup>), eluirlo con una mezcla de piridina/ácido acético glacial/agua (30:4:66) y, después de liofilización intermediaria, cromatografiarlo en Amberlite CG-50 (forma H<sup>+</sup>) con un tampón 0,5 molar de acetato amónico (pH 6,4).
10.  EJEMPLO 2
- a) Ester metílico de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína.
- A -10°, y por adición de 2,8 cc de trietilamina, se ajustó a pH de 8 aproximadamente una solución de 8,4 g
15. 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 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, se separó el
20. precipitado por filtración bajo vacío, se lavó con alcohol, acetato etílico y éter y se le secó. Punto de fusión: 195-197°C; [alfa]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -28,0° (c = 1 en dimetilformamida).
- b) Hidracida de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína.
25. A unos 4°C, se mezcló con 1,5 cc de hidrato de hidracina una solución, en una mezcla de 20 cc de dimetilformamida y 5 cc de sulfóxido de dimetilo, de 3 g del éster metílico de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína obtenido antes. Se dejó la mezcla en reposo a la temperatura
30. del ambiente durante 24 horas y se la filtró. Añadiendo agua al filtrado, se obtuvo un precipitado, que se separó por filtración bajo vacío, se lavó con agua y se secó. Pun-



to de fusión: 230-234°C;  $[\alpha]_D^{25} = -38,2^\circ$  (c = 1,1 en dimetilformamida).

c) Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida.

5. Se mezcló a -20°C una suspensión de 2,25 g de hidracina de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína en 25 cc de dimetilformamida con 6 cc de ácido clorhídrico 2,5 N en tetrahidrofurano. Se añadió a la solución 1 cc de nitrito de isoamilo. Se agitó la mezcla a -20°C durante 30 minutos, se la enfrió hasta -30°C y a esta temperatura, después de neutralizar con 2,08 cc de trietilamina, se la mezcló con una solución, en una mezcla de 10 cc de dimetilformamida y 10 cc de tetrahidrofurano, de 2,3 g de L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida, [preparada por hidrogenación sobre carbón paladiado de 3 g de Z-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida (obtenida según R. L. Huguenin y R.A. Boissonas. *Helv. 45*, 1629 -1962-) en metanol, a la presión normal y a la temperatura del ambiente]. Luego se agitó la mezcla durante una hora a -10°C, se guardó en el refrigerador por una noche, se filtró y se concentró el filtrado para excluir el tetrahidrofurano. Después de diluir con dimetilformamida, se precipitó el hexapéptido por adición de agua y se le purificó por lavado con alcohol y acetato de etilo. Punto de fusión: 180-182°C;  $[\alpha]_D^{25} = -40,6^\circ$  (c = 0,5 en dimetilformamida).
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

d) Beta-benciltiopropionil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-proil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida.

30. Se mezcló una solución de 1,6 g de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-proil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida en 20 cc de ácido acético glacial con 20 cc de bromuro de hidrógeno 4N en ácido acético glacial. Se



- 3 JUL -

- agitó la mezcla a la temperatura del ambiente durante 2 horas, se la instiló a continuación en 500 cc de éter y el bromhidrato precipitado se lavó con éter, se secó y se disolvió en 5 cc de dimetilformamida. Se ajustó esta solución a pH 7,5
5. por adición de etildiisopropilamina y se le añadió a una solución de beta-benciltiopropionil-L-tirosil-L-isoleucinacida [obtenida mezclando a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 0,7 g de beta-benciltiopropionil-L-tirosil-L-isoleucinhidrácida (obtenida según R. L. Huguenin, Helv. 49, 711 -1965-) disuelta en una mezcla de 5 cc
10. de sulfóxido de dimetilo, 10 cc de dimetilformamida y 4 cc de ácido clorhídrico 2,4 N en tetrahidrofurano, con 0,3 cc de nitrito de isoamilo y neutralizando la mezcla por adición de 1,65 cc de etildiisopropilamina después de 30 minutos de agitación a  $-20^{\circ}\text{C}$ ]. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$
15. y durante 30 minutos mas a  $-5^{\circ}\text{C}$ , se la guardó a continuación durante 3 días a  $+4^{\circ}\text{C}$  y se la concentró. Se disolvió el residuo en 5 cc de dimetilformamida y se precipitó el péptido por adición de una mezcla de 50 cc de etanol y 10 cc de agua. Se separó por filtración el precipitado, se le disolvió en 5 cc
20. de dimetilformamida, se le volvió a precipitar por adición de una mezcla de 15<sup>0</sup> cc de acetato de etilo y 50 cc de éter, se filtró, se lavó con acetato de etilo y con éter y se secó. Rendimiento: 0,9 g; punto de fusión:  $224-226^{\circ}\text{C}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -36,0^{\circ}$  ( $c = 0,5$  en dimetilformamida).
25. e) Diacetato de deamino<sup>1</sup>-(Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>)-argininovasopresina.
- De la manera que se ha descrito en el ejemplo 1, se convirtió beta-benciltiopropionil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>G</sup>-tosil-L-arginil-glicinamida en el diacetato de deamino<sup>1</sup>-
30. [Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>]-argininovasopresina.

EJEMPLO 3.

- a) Ester bencílico de Boc-L-Leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína.

- 3 JUL



- Se disolvieron en 50 cc de acetato de etilo, saturado con cloruro de hidrógeno, 5,16 g de éster bencílico de Boc-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína (preparado según M.F. Ferger y col., J. Amer. Chem. Soc. 94, 982 -1972-). Al cabo de 30 minutos se precipitó el clorhidrato con éter seco, se le separó por filtración bajo vacío, se le lavó con éter<sup>seco</sup> y se le secó en vacío sobre hidróxido potásico. Luego se disolvió el producto (3,74 g) con 3,52 g de sal dicitclohexilamínica de Boc-L-leucina y 2,02 g de L-hidroxi-benzotriazol en 40 cc de dimetilformamida. Después de añadir 1,94 g de dicitclohexilcarbodiimida en 5 cc de dimetilformamida, a 0°C, se agitó la mezcla durante 1 1/2 horas a 0°C y durante 5 1/2 horas a temperatura del ambiente, se la filtró, se la concentró bajo presión reducida, se la guardó durante 24 horas a 0°C y se la volvió a filtrar. El filtrado se concentró otra vez hasta unos 8-10 cc y luego se mezcló con 15 cc de agua. Al cabo de unas pocas horas se separó el péptido por succión, se le lavó con agua en abundancia, con solución saturada de bicarbonato sódico, con agua, con ácido sulfúrico 0,1-molar y con agua, se le secó y se le recristalizó de acetato de etilo y 2-propanol. Punto de fusión: 158-161°C;  $[\alpha]_D^{25} = -31,1^\circ$  (c = 1 en dimetilformamida).
- b) Ester bencílico de Boc-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína.
25. Se convirtió ester bencílico de Boc-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína, en el clorhidrato, de la manera ordinaria utilizando acetato de etilo saturado con cloruro de hidrógeno, seguido de precipitación con éter. 1,5 g del clorhidrato resultante, 0,64 g de hemihidrato de Boc-L-isoleucina, 0,54 g de L-hidroxibenzotriazol y 0,293 cc de N-metil-morfolina se disolvieron en 25 cc de dimetilformamida y se mezclaron a 0°C con 0,605 g de dicitclohexilcarbodiimida en



- 2 cc de dimetilformamida. Después de una hora de agitación a 0°C y de 6 horas a la temperatura del ambiente, se filtró la mezcla por succión. El filtrado se mezcló con agua y el producto precipitado se filtró por succión, se lavó con solución de bicarbonato sódico, con ácido sulfúrico 0,1 molar y con agua y se secó. Se disolvió el producto a 60°C en 250 cc de metanol. Se separó el residuo por succión y se concentró el filtrado hasta unos 80 cc. Mediante cristalización y elaboración de las aguas madres, se obtuvo el tetrapéptido protegido puro; punto de fusión: 218°C;  $[\alpha]_D^{25} = -38,8^\circ$  (c = 1 en dimetilformamida).
10. c) Ester bencílico de Boc-O-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína
15. Por tratamiento del derivado Boc con cloruro de hidrógeno en acetato de etilo y precipitación con éter se obtuvo el clorhidrato cristalino del éster bencílico de L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína. 0,81 g del clorhidrato, 0,485 g de Boc-O-bencil-L-tirosina, 0,27 g de L-hidroxi-benzotriazol y 0,131 cc de N-metilmorfolina se disolvieron en 30 cc de dimetilformamida y se mezclaron a 0°C con 0,278 g de dicitclohexilcarbodiimida en 5 cc de dimetilformamida. Se agitó la mezcla a 0°C durante 1 1/2 horas y a la temperatura del ambiente durante 18 horas, se la filtró, se concentró el filtrado hasta 10 cc bajo presión reducida y se precipitó el producto con abundancia de agua. El precipitado se lavó sobre el filtro de succión consecutivamente con solución de bicarbonato sódico, con agua, con ácido sulfúrico 0,1 molar y con agua y luego se disolvió en 200 cc de metanol caliente. Después de concentrar hasta 30 cc, se dejó cristalizar el producto, con lo cual se obtuvo en forma pura el pentapéptido protegido; punto de fusión: 225°C;  $[\alpha]_D^{25} = -25,2^\circ$  (c = 1 en dimetilformamida).
- 20.
- 25.
- 30.



d) Ester bencílico de beta-benciltiopropionil-O-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína.

5. Por tratamiento del derivado Boc con cloruro de hidrógeno en acetato de etilo y precipitación con éter se obtuvo el clorhidrato del éster bencílico de O-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína. 0,47 g de clorhidrato y 0,062 cc de N-metilmorfolina en 10 cc de dimetilformamida se mezclaron con una solución de 0,108 g de ácido beta-benciltiopropiónico y 0,136 mg de L-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina en 2 cc de tetrahidrofurano y se agitó a la temperatura del ambiente durante 18 horas. Se evaporó bajo presión reducida la mezcla de disolventes y el hexapéptido protegido que se obtuvo se trituró con acetato de etilo, se lavó con éter, con solución de bicarbonato sódico, con agua, con ácido sulfúrico 0,1 molar y otra vez con agua y se secó. Punto de fusión: 240°C (descomposición);  $[\alpha]_D^{25} = -28^\circ$  (c = 1 en dimetilformamida).

15. e) Disulfuro de beta-mercaptopropionil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-L-cisteína.

20. Se redujeron con sodio 460 mg de éster bencílico de beta-benciltiopropionil-O-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteína y 130 mg de urea en 150 cc de amoníaco seco, hasta que apareció una coloración azul estable durante 30 segundos. Después de añadir 184 mg de cloruro amónico, se liofilizó la mezcla reaccional. El residuo se guardó en vacío durante 16 horas sobre pentóxido de fósforo, se disolvió en 170 cc de agua desoxigenada y 60 cc de metanol, se filtró y, bajo barrido de nitrógeno, se instiló, simultáneamente con una solución, en 100 cc de metanol, de 136 mg de diyodoetano recién recristalizado, a una mezcla de 150 cc de agua y 50 cc de metanol, mientras se mantenía el pH



- a 7,5 (procedimiento según F. Weygand y G. Zumach, Z. Naturforsch. 17b, 807 -1962-). Una vez desvanecida la reacción de los grupos tiólicos (reactivo de Ellman), se concentró la mezcla hasta unos 50 cc bajo presión reducida, se filtró, se
5. ajustó a pH 2-3 con ácido acético, se volvió a filtrar y se liofilizó. EL producto bruto se disolvió en 20 cc de la fase inferior y 20 cc de la fase superior del sistema de disolventes 1-butano/ácido acético al 0,25% y, mediante 160 pasos de distribución, se desaló y se purificó parcialmente en este
10. sistema. Se concentraron y liofilizaron las fracciones que contenían el producto purificado, y se reprecipitó de alcohol isopropílico con éter diisopropílico el hexapéptido cíclico.  $[\alpha]_D^{25} = -38^\circ$  (c = 0,5 en metanol). Cromatografía de capa fina sobre gel de sílice con 1-butano/ácido acético/agua (100:15:35): Rf = 0,42.
- 15.

f) Diacetato de deamino<sup>1</sup>-(Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>)-argininovasopresina

- Una solución de 28,5 mg de disulfuro de beta-mercaptopropionil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-L-cisteína y 20 mg de dibromhidrato de L-prolil-L-arginil-
20. -glicinamida (preparado según D.T. Gish y V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc. <sup>Soc.</sup> 79, 3579 -1957-; R.O. Studer y V. du Vigneaud J. Am. Chem. Soc. 82, 1499 -1960-) en 0,4 cc de dimetilformamida se mezcló, después de la adición de 6 microlitros de trietilamina y 9,5 mg de 1-hidroxi-benzotriazol, a 0°C, con 10,3
25. mg de dicitclohexilcarbodiimida en 0,2 cc de dimetilformamida. Después de reposar durante 20 horas a la temperatura del ambiente, se diluyó la mezcla con agua, se acidificó con ácido acético y después de reposar a 0°C por 12 horas, se filtró. El filtrado resultante se cromatografió en Amberlite CG-50
30. (forma H<sup>+</sup>) con tampón de acetato amónico 0,5 molar (pH 6,4).

#### EJEMPLO 4

a) Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-proil-N<sup>épsilon</sup>-tosil-L-lisil-glicinamida



- Se disolvieron en 60 cc de ácido acético glacial, con calentamiento, 14,0 g de Z-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-proil-N<sup>épsilon</sup>-tosil-L-lisil-glicinamida (preparado según M-Bodanszky y col., J. Amer. Chem. Soc. 82, 3195.-1960-)
5. y la solución se mezcló a la temperatura del ambiente con 60 cc de solución 5 N de bromuro de hidrógeno/ácido acético glacial. Se agitó la mezcla durante una hora a la temperatura del ambiente y a continuación se la instiló en 600 cc de éter. El bromhidrato del pentapéptido precipitado se lavó con éter, se secó sobre hidróxido potásico y pentóxido de fósforo y se disolvió en 100 cc de metanol. Se pasó la solución a través de una columna de Dowex 2 (forma OH<sup>-</sup>), se concentró el eluato bajo presión reducida y se disolvió el residuo en 60 cc de dimetilformamida. Se mezcló la solución, a 0°C, con 6,55 g de
10. Z-Leu-OPhNO<sub>2</sub>, se guardó la mezcla durante 2 días a la temperatura del ambiente, se precipitó el hexapéptido protegido por adición de 600 cc de acetato de etilo, se le lavó con éter y con acetato de etilo y se lo secó. Rendimiento: 11,6 g; punto de fusión: 223-225°C;  $[\alpha]_D^{25} = -43,9^{\circ}$  (c = 1,0 en dimetilformamida).
15. 20. b) Z-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>épsilon</sup>-tosil-L-lisil-glicinamida.
- De 11,0 g de Z-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-
25. -cisteinil-L-prolil-N<sup>épsilon</sup>-tosil-L-lisil-glicinamida se disoció de la manera que se ha descrito en a) el grupo protector Z y el hexapéptido no protegido conteniendo el grupo amínico terminal, se hizo reaccionar con 5,0 g de Z-L-Ile-OPhNO<sub>2</sub> en 60 cc de dimetilformamida. Se guardó la mezcla a la temperatura del ambiente durante 3 días, se precipitó por adición
30. de 600 cc de acetato de etilo el heptapéptido protegido se lavó el precipitado con éter y acetato de etilo y se secó.



Rendimiento: 9,6 g; punto de fusión: 224-227°C;  $[\alpha]_D^{25} = -43,3^\circ$  (c = 0,5 en dimetilformamida).

- c) Z-O-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>épsilon</sup>-tosil-L-lisil-glicinamida.
- 5.

De 4,5 g de Z-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-propil-N<sup>épsilon</sup>-tosil-L-lisil-glicinamida se disoció de la manera que se ha descrito en (a) el grupo protector Z y el heptapéptido no protegido conteniendo el grupo amínico terminal, se hizo reaccionar con 2,1 g de Z-O-bencil-L-Tir-OPhNO<sub>2</sub> en 60 cc de dimetilformamida. Después de 12 horas de reposo a la temperatura del ambiente, se instiló en etanol la mezcla reaccional, se separó por filtración el octapéptido protegido precipitado, se le lavó con etanol y con éter y se secó. Rendimiento: 4,2 g; punto de fusión: 230-232°C;  $[\alpha]_D^{25} = -18,5^\circ$  (c = 1 en dimetilformamida).

10.

15.

- d) Beta-benciltiopropionil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>épsilon</sup>-tosil-L-lisil-glicinamida.

Se disolvieron en 25 cc de ácido acético glacial 3,0 g de Z-O-bencil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>épsilon</sup>-tosil-L-lisil-glicinamida y se mezcló la solución con 25 cc de una solución 5 N de bromuro de hidrógeno/ácido acético glacial. Después de una hora de agitación, se instiló la mezcla en 500 cc de éter, se separó por filtración el precipitado, se lavó con éter y se le secó sobre hidróxido potásico y pentóxido de fósforo. EL bromhidrato del octapéptido así obtenido se disolvió en 25 cc de dimetilformamida. La solución se ajustó a pH 7,0 por adición de N-metilmorfolina y se mezcló con 0,7 g de éster p-nitrofenílico de ácido beta-benciltiopropiónico.

20.

25.

30.



- Después de 12 horas de reposo a la temperatura del ambiente, se instiló la mezcla reaccional en una mezcla de etanol y acetato de etilo (1:1) y se separó por filtración el precipitado. El péptido protegido que así se obtuvo se disolvió en
5. dimetilformamida y se volvió a precipitar por instilación de la solución en acetato de etilo. El precipitado se lavó con acetato de etilo y con éter y se secó. Rendimiento: 1,25 g; punto de fusión: 224°-225°C;  $[\alpha]_D^{25} = -40^\circ$  (c = 1,0 en dimetilformamida).
10. e) Diacetato de deamino<sup>1</sup>-[Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>]-lisinovasopresina
- Se redujeron con sodio 350 mg de beta-benciltiopropionil-L-tirosil-L-isoleucil-L-leucil-L-asparaginil-S-bencil-L-cisteinil-L-prolil-N<sup>épsilon</sup>-tosil-L-lisil-glicinamida en 350 cc de amoníaco líquido. Después de excluir el amoníaco,
15. se disolvió el residuo en 500 cc de ácido acético al 1% y se ajustó la solución a pH 7,8 con hidróxido sódico. Luego se añadieron 52 cc de una solución 0,01 molar de  $K_3[Fe(CN)_6]$ , mientras se mantenía el pH a 7,2-7,8 por adición de hidróxido sódico. Se guardó la mezcla reaccional a 4° durante 15 horas
20. y se la pasó a través de una columna de Amberlite IR-45 (forma  $Cl^-$ ). Se acidificó el eluato con ácido acético y se le adsorbió 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
25. dos veces el eluato con recogida intermedia en agua. Para ulterior purificación, se disolvió el liofilizado en 3 cc de un tampón 0,5 molar de acetato amónico (pH = 6,4) y se volvió a cromatografiar con este tampón en una columna de Amberlite CG-50 (forma  $H^+$ ). Se liofilizó varias veces el eluato. Rendimiento: 107 mg;  $[\alpha]_D^{25} = -61,0^\circ$  (c = 1,0 en ácido acético al 95%).
- 30.

Electroforesis de papel:



Tampón a base de 2 cc de ácido acético glacial y 20 cc de piridina, completado con agua hasta 1 litro (pH = 6,0); Rf. (lisina) = 0,45 ± 0,05.

5. Tampón a base de 37 cc de ácido fórmico y 25 cc de ácido acético, completado con agua hasta 1 litro (pH = 1,7); Rf (lisina) = 0,28 ± 0,05.

Los ejemplos que siguen ilustran preparaciones farmacéuticas conteniendo los nonapéptidos proporcionados por el presente invento.

10. EJEMPLO A

Las pastillas sublinguales pueden contener los ingredientes siguientes:

	a) Diacetato de deamino <sup>1</sup> -[Ile <sup>3</sup> , Leu <sup>4</sup> ]-argininovasopresina	5,70 mg
15.	Lactosa	66,30 mg
	Azúcar (en polvo)	20,0 mg
	Kollidon K25	7,00 mg
	Estearato magnésico	1,00 mg
		<hr/>
		100,00 mg
20.	b) Diacetato de deamino <sup>1</sup> -[Ile <sup>3</sup> , Leu <sup>4</sup> ]-argininovasopresina	11,40 mg
	Lactosa	71,60 mg
	Manitol	60,00 mg
	Hidroxipropil-metilcelulosa	5,00 mg
25.	Estearato magnésico	2,00 mg
		<hr/>
		150,00 mg

EJEMPLO B

Una solución para inyección en ampollas de 5 cc puede contener, por cc, los ingredientes siguientes:



	Diacetato de deamino <sup>1</sup> -[Ile <sup>3</sup> , Leu <sup>4</sup> ]-	
	-argininovasopresina	0,12 mg
	Cloruro sódico	9,00 mg
	Acido clorhídrico, 0,1 N a pH 3,5	c.s.
5.	Agua para inyección hasta	1,0 cc

EMPLO C

Un liofilizado para una solución acuosa puede contener los ingredientes siguientes:

		<u>Partes en peso</u>
10.	Diacetato de deamino <sup>1</sup> -[Ile <sup>3</sup> , Leu <sup>4</sup> ]-	
	-argininovasopresina	11,40
	Acido L-málico	0,87
	D-manitol	150,00
15.		<hr/> 162,27

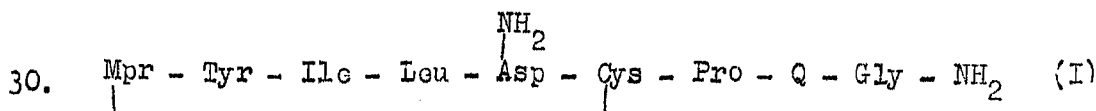
Para preparar una solución de inyección lista para el uso, se disuelven 162,27 mg del liofilizado en 10 cc de agua destilada.

= . =

20. REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente suiza nº 9988/72 del 4 Julio de 1.972.

25. 1.- Un procedimiento para la preparación de nona-péptidos que constituyen ingredientes activos en composiciones farmacéuticas de propiedades natriuréticas, de la fórmula general





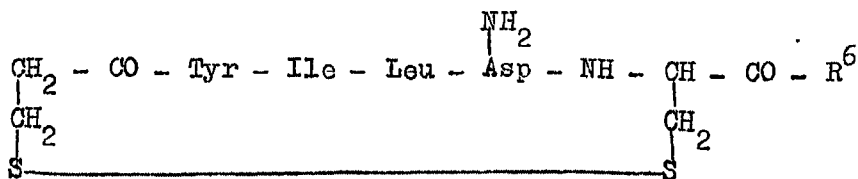




5. Q' significa una agrupación de la fórmula  

$$-\text{NH}-\text{CH}[-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NHR}^2]-\text{CO}-$$
 o  

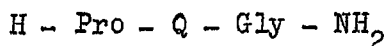
$$-\text{NH}-\text{CH}[-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{R}^3]-\text{CO}-$$
 en donde  
R<sup>2</sup> significa un átomo de hidrógeno o un grupo protector del radical guanidínico y  
R<sup>3</sup> significa un átomo de hidrógeno o un grupo protector del grupo épsilon-amínico de la lisina, siempre que por lo menos uno de los radicales
10. R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> represente un grupo protector y  
R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> representan cada uno un átomo de hidrógeno o un grupo protector y en donde todos los aminoácidos con un átomo de carbono asimétrico presentan configuración L,
15. con disociación simultánea del grupo o los grupos protectores, y convertir el producto obtenido, si se desea, por reacción con un ácido orgánico o inorgánico, en una sal de adición de ácido atóxica y farmacéuticamente utilizable, o bien
20. d) amidar un péptido de la fórmula general
- $$\text{Mpr} - \text{Tyr} - \text{Ile} - \text{Leu} - \overset{\text{NH}_2}{\text{Asp}} - \text{Cys} - \text{Pro} - \text{Q} - \text{Gly} - \text{R}^6 \quad (\text{VI})$$
- en la que
25. Q significa el radical de la lisina o de la arginina,  
Mpr significa el grupo beta-mercaptopropionílico y  
R<sup>6</sup> significa un grupo hidroxílico o un radical activador del grupo carboxílico,
30. o bien
- e) hacer reaccionar un hexapéptido de la fórmula general



(VII)

5.

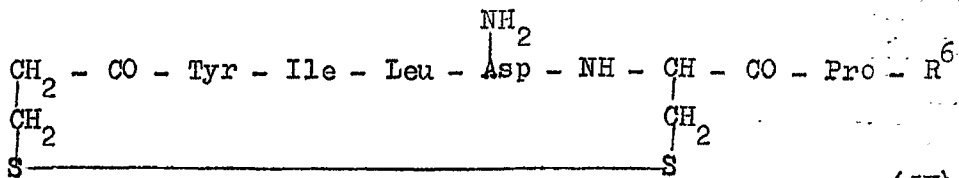
con un tripéptido de la fórmula general



(VIII)

10.

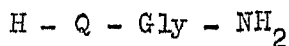
o hacer reaccionar un heptapéptido de la fórmula general



(IX)

15.

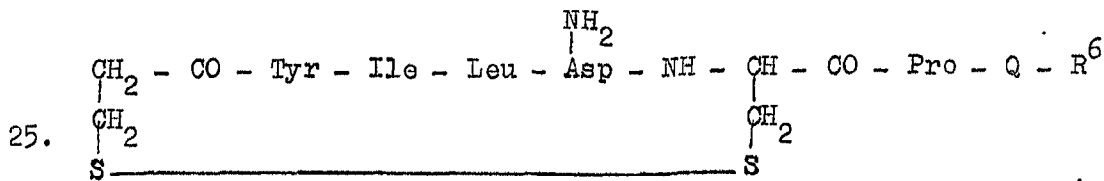
con un dipéptido de la fórmula general



(X)

20.

o hacer reaccionar un octapéptido de la fórmula general



(XI)

25.

con glicinamida y convertir, si se desea, el nonapéptido resultante en una sal de adición de ácido atóxica y farmacéuticamente utilizable.

30.

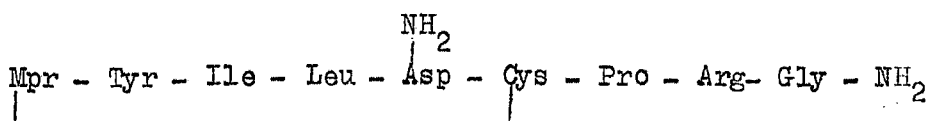
En las fórmulas VII a XI, R<sup>6</sup> representa un grupo hidroxílico o un grupo activador del grupo car-

*[Handwritten signature]*



boxílico; Q significa el radical de la arginina o de la lisina y todos los aminoácidos con un átomo de carbono asimétrico presentan configuración L.

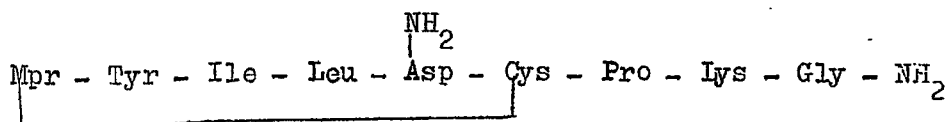
- 5. 2.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por prepararse un compuesto de la fórmula



- 10. (Ia)

o una sal de adición de ácido atóxica y farmacéuticamente utilizable respectiva.

- 15. 3.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por prepararse un compuesto de la fórmula



(Ib)

- 20. o una sal de adición de ácido atóxica y farmacéuticamente utilizable respectiva.

- 25. 4.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por prepararse diacetato de deamino<sup>1</sup>-[Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>]-argininovasopresina.

5.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado por prepararse diacetato de deamino<sup>1</sup>-[Ile<sup>3</sup>, Leu<sup>4</sup>]-lisinovasopresina.

- 30. 6.- Un procedimiento para la preparación de nona-péptidos.

Según se describe y reivindica en la presente memo-



ria descriptiva que consta de 33 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 3 de Julio de 1973

p.a.

JAIME ISERN

p. p.

Firmado: JOSE F. NIETO

mpc.