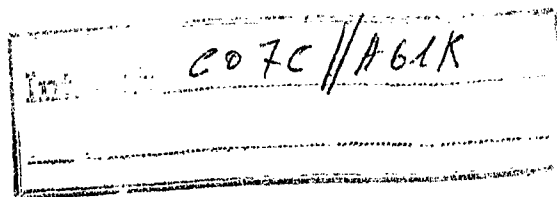


418158



P.- 55.338
06980-67/PT/szf

MEMORIA DESCRIPTIVA



para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de RICHTER GEDEON VEGYÉSZETI GIÁR RT.

entidad húngara

establecida en 21 Gyömrői ut, Budapest X, Hungría.

por: "UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE NUEVOS PEPTIDOS".

(Clase Internacional C07c)



Esta invención se refiere a nuevos péptidos de actividad de ACTH que contienen ácidos alfa-aminooxi carboxílicos sobre ambos terminales, y a un procedimiento para la preparación de estos compuestos.

5 Como es sabido, la cadena peptídica de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) puede modificarse en alto grado sin que desaparezca la actividad adrenocorticotrópica. Así, por ejemplo, puede eliminarse más de la tercera parte de la cadena de aminoácido de la parte
10 de C terminal de la molécula, sin disminución alguna en la actividad específica. No obstante, la eliminación de más aminoácidos causa un brusco descenso en la actividad. El péptido con la secuencia de aminoácidos 1-9 de la ACTH posee el 30% de la actividad de la molécula original, mientras que la actividad del fragmento 1-16
15 de ACTH es sólo de aproximadamente el 1% de la sustancia de partida. Por otro lado, la separación del primer aminoácido de la parte de N terminal de la molécula causa un descenso del 50 % en la actividad (E. Schröder,
20 K. Lübke: Los péptidos, Academic Press, Nueva York, 1966, págs. 246 a 249).

 Los fragmentos de ACTH en los que el grupo de serina de N terminal está sustituido por un D-aminoácido, un aminoácido no natural o un grupo acilo obtenido
25 omitiendo los grupos funcionales de la serina (por ejem



5 plo un grupo beta-hidroxipropionilo o propionilo), poseen algunas veces actividades que sobrepasan las de la ACTH natural. Esto puede atribuirse, posiblemente, al hecho de que estos fragmentos de ACTH de estructuras modifica-
10 das son resistentes a la acción de las enzimas del tipo de aminopeptidasa, y así su velocidad de descomposición en el organismo es inferior a la de la ACTH natural. Por consiguiente, estos fragmentos de ACTH modificados mues-
15 tran potentes actividades adrenocorticotrópicas también en los casos en que el grupo modificador no puede asumir enteramente el papel del resto de serina de N terminal de la hormona natural.

15 El hecho de que el efecto de los derivados de amida de C terminal disminuya más despacio que el de los péptidos que contienen grupos carboxilo libres cuando disminuye el número de los aminoácidos a partir del ex-
20 tremo C terminal de la cadena puede atribuirse a las mis-
25 mas razones. Es decir, la mayoría de las enzimas de carboxipeptidasa no pueden descomponer las péptido-amidas. Por lo tanto, se supuso que amidando el grupo carboxilo de C terminal puede asegurarse el mismo efecto protector que por medio de la sustitución apropiada del resto de serina de N terminal. En las investigaciones más recientes se observó, sin embargo, que algunas enzi-
mas del tipo de carboxipeptidasa son capaces de eliminar



incluso los restos de aminoácido de C terminal de las péptidoamidas (J. D. Glass y otros: Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 63, 1426/1969/). Por el hecho de que incluso estas enzimas no pueden hidrolizar las amidas sustituidas, po
5 dría esperarse que los fragmentos de ACTH que contienen un grupo amida sustituido sobre el extremo de C terminal de la cadena se descompondrían en el organismo a una velocidad inferior, y mostrarían por lo tanto un mayor efecto biológico que las amidas simples apropiadas. Cier
10 tamente, los investigadores alemanes consiguieron preparar algunos derivados de heptadecapeptido-alcoholamida que poseían fuertes efectos adrenocorticotrópicos (Solicitud publicada de Patente alemana nº 1.954.794).

Se ha encontrado en esta invención que pueden
15 obtenerse compuestos de superiores actividades adrenocorticotrópicas cuando se sustituyen ambos aminoácidos terminales de los fragmentos 1-17, 1-18 ó 1-19 de la molécula de ACTH por un alfa-aminoácido. Se obtienen compuestos de actividad particularmente elevada cuando se sustituye el resto de serina de N terminal del fragmento 1-18
20 de la ACTH por ácido D-alfa-aminoxi-beta-hidroxi-propiónico, y sustituyendo el resto de arginina del terminal C del mismo compuesto por ácido L- ó D-alfa-aminoxi-epsil
lon-aminocaproico.

25 Por consiguiente, esta invención se refiere a

-5 NOV 1964

nuevos péptidos de actividades de ACTH, que tienen una se-
cuencia de ACTH completa desde el aminoácido de N termi-
nal hasta al menos el 17º, pero no más del aminoácido 19º,
pero que contienen opcionalmente otros aminoácidos en
5 lugar de los aminoácidos individuales de la secuencia de
ACTH, y que contienen siempre un alfa-aminoácido en
lugar de los aminoácidos primero y último. La invención
se refiere además a las sales de adición de ácidos, deri-
vados y complejos de dichos péptidos, así como a un pro-
cedimiento para la preparación de estos compuestos.
10

En los péptidos sustituidos citados anterior-
mente, los aminoácidos individuales de la secuencia natu-
ral pueden sustituirse por otros aminoácidos, siempre
que esta sustitución no cause un descenso importante en la
15 actividad de ACTH. Así, por ejemplo, el segundo aminoáci-
do (tirosina) puede sustituirse por fenilalanina, y/o el
tercer aminoácido (serina) puede sustituirse por glicina,
y/o el cuarto aminoácido (metionina) puede sustituirse
por leucina, norvalina, norleucina o ácido alfa-aminobuti-
rico, y/o el quinto aminoácido (ácido glutamínico) puede
20 sustituirse por glutamina, y/o los ácidos 15º y 16º (li-
sina) pueden sustituirse por ornitina, y/o los aminoáci-
dos 17º y 18º (argininas) pueden sustituirse por lisina
u ornitina. Los compuestos más ventajosos con respecto a
25 sus actividades adrenocorticotrópicas son (D-OSer¹, OLis¹⁸)-



-alfa ^{1-18NH₂}-ACTH y (D-OSer¹, D-OLis¹⁸- alfa ^{1-18NH₂}-ACTH, donde "OSer" representa el ácido alfa-aminooxido-beta-hidroxi-propiónico, que difiere sólo de la serina en el átomo aislado de oxígeno entre el átomo de carbono alfa y el grupo amino. En la Memoria descriptiva, estas abreviaturas se usan para designar los alfa-aminooxiácidos que tienen estructuras similares a un aminoácido, y así, por ejemplo, OLis representa ácido alfa-aminooxi-epsilon-aminocaproico, etc.

10 Los nuevos péptidos de actividades de ACTH, así como sus sales de adición de ácidos, derivados y complejos, pueden prepararse, según la invención, a partir de un péptido protegido que tiene una secuencia de ACTH completa a partir del aminoácido del terminal N hasta al menos el 17^o, pero no más del 19^o aminoácido, pero que opcionalmente contiene otros alfa-aminoácidos en lugar de los aminoácidos individuales de la secuencia de ACTH, conteniendo siempre un alfa-aminooxiácido en lugar de los aminoácidos primero y último, y llevando grupos protectores al menos sobre el grupo aminooxídico terminal y sobre los grupos amino de las cadenas laterales, y opcionalmente también sobre los grupos carboxilo terminales y sobre los grupos carboxilo de las cadenas laterales, eliminando la protección de dicho péptido en una o más operaciones, y, si se desea, convirtiendo al compues

15
20
25



to obtenido en sus sales de adición de ácido, derivados o complejos.

Los péptidos protegidos usados como sustancias de partida según la invención pueden prepararse a partir de los alfa-aminoácidos apropiados por condensación de fragmentos, o por introducción gradual de los aminoácidos individuales en la secuencia adecuada. En estos procedimientos de condensación pueden usarse el método del anhídrido mixto, el método de la azida, el método del éster activo, o el método DCC. Puede aplicarse también la llamada síntesis en fase sólida, según la cual se forma un péptido unido a un polímero sobre un grupo carboxilo terminal acoplado el alfa-aminoácido del terminal unido al polímero con los aminoácidos y con el alfa-aminoácido terminal en la secuencia apropiada.

Los grupos reactivos que no se dejan participar en la reacción son protegidos preferiblemente por grupos protectores que pueden extraerse de nuevo fácilmente, por ej. por hidrólisis, acidólisis, hidrazinólisis o reducción. El grupo carboxilo es protegido preferiblemente en forma de su éster de metilo, terc-butilo, bencilo, p-clorobencilo o p-nitrobencilo, o convirtiéndolo en una amida. Los grupos amino y aminos son protegidos preferiblemente con grupos tosilo, tritilo, formilo, trifluoroacetilo, o-nitrosulfenilo, ftalilo, benciloxicarbonilo,



p-clorobencil-oxicarbonilo, y, lo más preferiblemente, terc-butoxicarbonilo. El grupo guanidino del resto de arginina puede protegerse preferiblemente con un grupo nitró, pero este grupo puede protegerse también en forma protonizada. El grupo imino de la histidina puede protegerse con grupos bencilo, tritilo o dinitrofenilo. Los grupos hidroxilo unidos a las cadenas laterales pueden protegerse opcionalmente por formación de éter, y en este caso los más preferidos son los éteres de terc-butilo y de bencilo.

Por selección apropiada de los grupos protectores se pueden preparar compuestos que pueden desprotegerse selectivamente o en una sola operación por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, por hidrólisis, acidólisis, hidrazinolisis o reducción).

Según un método preferido de la invención, un alfa-aminoácido protegido se condensa con un éster tripeptido-metílico de la fórmula Tir-Ser-Met-OCH₃, el éster tetrapeptido-metílico sustituido obtenido es convertido en su hidrazida y finalmente en la azida, y esta azida se usa para la acilación de un decapeptido de la fórmula Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli. El tetradecapeptido sustituido así obtenido se condensa con un éster de péptido formado a partir de la posterior secuencia completa de aminoácidos adecuadamente protegida,



el éster de péptido sustituido obtenido es convertido en su hidrazida y finalmente en la azida, y esta azida se usa para la acilación del derivado de aminoácido del C terminal apropiadamente protegido. Así, por ejemplo, el tetradecapéptido sustituido es condensado con el éster de dipéptido 15-16, éster de tripéptido 15-17 o éster de tetrapéptido en 15-18, respectivamente, para producir el heptadecapéptido, octadecapéptido o nonadecapéptido adecuadamente sustituido, respectivamente. En esta reacción de condensación pueden emplearse con gran ventaja los métodos de copulación del DCC ó del éster activo. En este último método, particularmente cuando se usa un éster de pentaclorofenilo o pentafluorofenilo, el éster activo no precisa ser preparado por separado, sino que puede formarse directamente en la mezcla de reacción a partir del tetradecapéptido sustituido con pentaclorofenol o pentafluorofenol y DCC (véase por ejemplo la Patente Británica nº 1.201.053).

También se puede proceder como sigue: el derivado de aminoácido del terminal C adecuadamente protegido es acilado con un dipéptido 15-16, tripéptido 15-17 o tetrapéptido 15-18 adecuadamente protegido, el grupo protector del terminal N del péptido sustituido así obtenido es separado selectivamente, y la sustancia obtenida es condensada con el tetradecapéptido sustituido,



para producir el péptido protegido adecuado que contiene aminoácidos sobre ambos terminales. Al final de esta síntesis, los grupos terc-butoxicarbonilo unidos al grupo alfa-aminooxi de N terminal y a los grupos aminos de las cadenas laterales, los grupos de éster de terc-butilo unidos a los grupos carboxilo de las cadenas laterales, y, cuando no está amidado, también el grupo carboxilo de C terminal, así como los grupos de éster de terc-butilo opcionalmente unidos a los grupos hidroxilo de las cadenas laterales, son escindidos simultáneamente por acidólisis, por ejemplo, por tratamiento con ácido trifluoroacético. Cuando el péptido protegido de partida contiene también grupos que no pueden eliminarse usando ácido trifluoroacético, por ejemplo un grupo formilo, estos grupos son eliminados antes de la eliminación de los demás grupos protectores, o después de la misma, en una operación separada. El producto final desprotegido puede purificarse por una distribución en contracorriente o por cromatografía en columna, por ejemplo por cromatografía de cambio de iones, usando diferentes tipos de carboximetilcelulosas.

Dependiendo de los métodos de preparación y de las condiciones de reacción, los nuevos compuestos se obtienen en forma de las bases libres o en forma de sus sales. Las sales pueden convertirse en las bases libres



5 por métodos muy conocidos en la técnica. Por otro lado, las bases libres pueden convertirse en sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables poniéndolas en contacto con ácidos orgánicos o minerales, por ejemplo ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, fórmico, acético, láctico, tartárico, cítrico, ácidos grasos superiores, etc.

10 Los derivados de los nuevos compuestos, que también están comprendidos en el objeto de la invención, son por ejemplo los ésteres, las amidas, las amidas N-sustituidas, en primer lugar las peptidoamidas amidadas en el grupo carboxilo de C terminal y que contienen opcionalmente grupos carboxilo libres en la cadena lateral.

15 Los complejos utilizables farmacéuticamente de los nuevos péptidos según la invención son compuestos formados poniendo en contacto los nuevos péptidos con ciertas sustancias orgánicas o minerales que aseguran una actividad prolongada a los péptidos. Estos compuestos orgánicos pueden ser, por ejemplo algunos tipos de gelatina, 20 diversas carboximetilcelulosa, alginatos, poliflore-tinfosfato, aminoácidos polímeros u otros polímeros o copolímeros. Entre los compuestos minerales pueden tenerse en cuenta en primer lugar todos los hidróxidos y las sales difícilmente solubles (por ejemplo fosfatos o pirofosfatos) de zinc. Con el fin de asegurar una actividad 25



prolongada pueden usarse también algunos silicatos, que forman con los péptidos complejos insolubles de estructuras hasta ahora desconocidas.

5 Los nuevos péptidos y sus sales, derivados o complejos pueden usarse en terapéutica en forma de productos farmacéuticos. Estos productos farmacéuticos pueden contener los agentes activos en combinación con excipientes orgánicos o minerales adecuados para administración por vía enteral o parenteral. Los productos farmacéuticos
10 pueden ser, por ejemplo productos liofilizados sólidos, en los que pueden usarse como vehículos o excipientes compuestos inertes para los péptidos, tales como manita, lactosa o almidón. Las suspensiones o emulsiones pueden contener además del ingrediente activo y el vehículo agen
15 tes protectores o estabilizantes inertes. Los productos farmacéuticos más ventajosos contienen los nuevos péptidos en forma de sus complejos citados anteriormente, lo que asegura al producto una actividad prolongada.

20 Los productos farmacéuticos pueden contener los agentes activos en las cantidades usadas comúnmente para las hormonas adrenocorticotrópicas, por ejemplo en una concentración de 0,1 a 5 mg/ml. Estos productos pueden administrarse de 1 a 7 veces al día por vía subcutánea, intra
muscular o parenteral .

25 El procedimiento de la invención se explica con



detalle con ayuda de los siguientes Ejemplos no limitativos.

Las abreviaturas usadas en los Ejemplos para la denominación del aminoácido y los derivados de los péptidos son las ofrecidas por la IUPAC-IUB (J.Biol. Chem. 247, 977 /1972/). Los alfa-aminoácidos están también indicados por los símbolos OSer, OIis, como se ha discutido anteriormente. Si no se indica otra cosa, estas abreviaturas se refieren a la configuración L, con la excepción del Gli. Se han usado en los Ejemplos las otras abreviaturas que siguen: PCPOH = pentaclorofenol, PFPOH = pentafluorofenol, DCC = díciclohexilcarbodiimida, DCU = díciclohexilurea, BOC = terc-butoxicarbonilo, Bu^t = terc-butilo, For = formilo, ONSu = N-succinimidiloxi.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato del tipo del Dr. Tottoly (Büchli, Suiza). Los exámenes cromatográficos en capa delgada se efectuaron sobre un absorbente "Silicagel nach Stahl", usando las siguientes mezclas disolventes:

- 1) acetato de etilo : (piridina:ácido acético:agua = 20:6:11) = 99:1
- 2) acetato de etilo : (piridina:ácido acético:agua = 20:6:11) = 8:2
- 3) acetato de etilo : (piridina:ácido acético:agua = 20:6:11) = 6:4

26.10.73



Ejemplo 1

D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-
-Gli-Lis-Lis-Lis-OLis-NH₂

5 0,75 g (0,267 moles) de BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-
-Glu-(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)
-OLis(For)-NH₂ se disuelven en una mezcla de 6 ml de
ácido trifluoroacético, 0,75 ml de agua y 0,75 ml de ani
sol; la disolución se deja reposar durante una hora, y
después se diluye con 150 ml de éter. El precipitado que
10 se forma se separa por filtración, se lava con éter, y
se seca en vacío sobre pentóxido de fósforo e hidróxido
de potasio. Los 0,70 g (86%) de formil-octapéptido-trifluoro
acetato sustituido así obtenidos se disuelven en 10 ml
de agua, y se añaden 0,25 ml de mercaptoetanol a la diso
15 lución. El pH de la mezcla se ajusta a 5 con disolución
N de hidróxido de sodio, y después se añaden 11,5 ml de
una disolución 2 molar de acetato de hidrazida. La mez-
cla se mantiene en un baño de agua a 95°C durante dos ho
ras, y después se concentra en vacío y se vierte sobre
20 una columna de cambiador de iones Whatman CM-52. La sus-
tancia se eluye con una disolución tampón de gradiente
lineal preparada a partir de tampones de acetato de amonio
0,2 molar (pH = 6,7) y 0,5 molar (pH = 6,7). Las fraccio-
nes apropiadas se liofilizan produciendo 0,275 g (38%)
25 de la amida de octadecapéptido sustituida apropiada



La octadecapéptido amida sustituida protegida usada como sustancia de partida se prepara como sigue:

Operación 1: Acido L-alfa-terc-butoxicarbonil-aminooxi-epsilon-formilaminocaproico (BOC-OLis/For/).

5 23,2 g (60 mmoles) de N-epsilon-formil-D-lisina y 43,2 g (423 mmoles) de bromuro de sodio se disuelven en 248 ml de ácido sulfúrico 2,5 N. La disolución se enfría a 0°C, y se añaden 13,3 g (192 mmoles) de nitrito de sodio a la disolución agitada, en pequeñas porciones, en
10 un período de 30 minutos. La mezcla de reacción se agita durante una hora a 0°C y durante otra hora más a temperatura ambiente, y después se somete a extracción con tres porciones de 200 ml de éter. Las disoluciones etéreas reunidas se secan y se evaporan. Los 18,4 g de ácido D-alfa-
15 bromo-epsilon-formilamino-caproico crudo residuales se disuelven en 190 ml de etanol, y se añaden a la disolución 8,4 g (150 mmoles) de hidróxido de potasio y 10,0 g (76 mmoles) de terc-butoxicarbonil-hidroxi-
20 lamina. La mezcla de reacción se somete a reflujo durante 2 horas, y después se deja reposar a temperatura ambiente. Al día siguiente, el disolvente se separa por destilación, el residuo se disuelve en 80 ml de agua, y el pH de esta disolución se ajusta a 3 con ácido clorhídrico al 10%. La disolución ácida se satura con cloruro de sodio y se somete a
25 extracción con 3 x 150 ml de éter, y finalmente con 150



5 ml de acetato de etilo. Se reunen las disoluciones orgánicas, se secan y se evaporan, y el residuo cristalino, que pesa 16 g, se recristaliza a partir de 25 ml de acetato de etilo. Se obtienen 10,4 g (27%) de ácido L-alfa-terc-butoxicarbonil-aminoxí-epsilon-formilamino-caproico;

p. de f. 114-116°C, $R_f/2/ = 0,31$, $(\alpha)_D = -52,5^\circ$ (c = 1, en metanol).

10 Análisis: Calculado para $C_{12}H_{22}N_2O_6$ (290,32) : C 49,6%;
H 7,65%
Encontrado: C 49,9%;
H 7,6%

Operación 2: Amida de ácido L-alfa-terc-butoxi carbonil-aminoxí-epsilon-formilamino-caproico (BOC-OLis-For/-NH₂).

15 5,0 g (17,2 mmoles) de BOC-OLis-For/ se disuelven en 107 ml de tetrahidrofurano seco, y a la disolución se le añaden 1,90 ml (17,2 mmoles) de N-metilmorfolina. La mezcla se enfría a -10°C, y se añaden gota a gota, con agitación, 2,25 ml (17,2 mmoles) de cloroformiato de isobutilo. La mezcla se mantiene a la misma temperatura durante 10 minutos, después se enfría a -20°C, y se añaden cuidadosamente a la mezcla 10,7 ml (142 mmoles) de hidróxido de amonio concentrado. La mezcla obtenida se agita durante una hora a 0°C, y durante una hora más a temperatura ambiente. Después se evapora el tetrahidrofurano, y

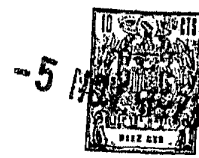
25



el residuo parcialmente cristalino se diluye con 20 ml de una mezcla 900:54:16:30 de acetato de etilo:piridina:ácido acético:agua. La mezcla se vierte sobre una columna de gel de sílice de 250 ml, y la columna se eluye con la misma mezcla disolvente. Las fracciones que contienen el producto deseado se recogen y se evaporan para producir 4,3 g (86%) de BOC-OLis/For/-NH₂ amorfa, de color amarillento claro. R_p/2/ = 0,54.

Operación 3: Acido terc-butoxicarbonil-D-alfa-aminooxi-beta-benciloxipropiónico.

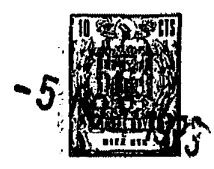
Una mezcla de 48,4 g (0,364 moles) de terc-butoxicarbonil-hidroxilamina, 40,7 g (0,728 moles) de hidróxido de potasio y 94,0 g (0,364 moles) de ácido DL-alfa-bromo-beta-benciloxipropiónico en 360 ml de agua se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la disolución es acidificada a pH = 3, y sometida a extracción con 3 x 720 ml de éter. Se reúnen las disoluciones etéreas, se lavan con 720 ml de agua, se secan y se mezclan con 78 ml (0,40 moles) de dicitclohexilcarbodiimida. Los 43,61 g obtenidos de sal de dicitclohexilamina de ácido terc-butoxicarbonil-DL-alfa-aminooxi-beta-benciloxipropiónico (p. de f. 144-146°C) se ponen en suspensión en 500 ml de éter, y la suspensión se agita con 5 x 100 ml de ácido sulfúrico 0,2 N. La disolución etérea se seca y se evapora hasta sequedad. El residuo se disuelve en



700 ml de etanol, y se añaden a la disolución 6,56 g (48,5 mmoles) de base de (+)-anfetamina. La disolución se deja reposar en un refrigerador durante la noche, y después los cristales formados se separan por filtración. La sal de (+)-anfetamina del ácido terc-butoxicarbonil-D-alfa-aminooxi-beta-benciloxipropiónico obtenida se recristaliza a partir de etanol, para producir 13,27 g de producto purificado; p. de f. 188-191°C, $(\alpha)_D^{26} = + 54^\circ$ (c = 0,5 en metanol). Después de la descomposición de la sal de la manera usual, se obtienen 7,9 g (14%) de ácido terc-butoxicarbonil-D-alfa-aminooxi-beta-benciloxipropiónico; p. de f. 96-98°C, $(\alpha)_D^{30} = + 38^\circ$ (c = 1 en etanol).

Operación 4: Acido terc-butoxicarbonil-D-alfa-aminooxi-beta-hidroxipropiónico (BOC-D-OSer)

5,5 g (17,7 mmoles) de ácido D-alfa-terc-butoxicarbonil-aminooxi-beta-benciloxipropiónico se disuelven en 110 ml de metanol, y la mezcla se hidrogena en presencia de 2,75 g de catalizador de paladio sobre carbón al 10%. Al cabo de 3 horas de hidrogenación, el catalizador es separado por filtración, y se evapora el disolvente. El residuo aceitoso se cubre con éter de petróleo y se deja reposar durante varias horas. La sustancia cristalina se separa por filtración y se seca. Se obtienen 3,65 g (96%) de ácido D-alfa-terc-butoxicarbonil-aminooxi-beta-hidroxipropiónico; p. de f. 94-95°C, $R_f/1/ = 0,27$.



Operación 5: BOC-D-O Ser-Tir-Ser-Met-N₂H₃

4,4 g (20 mmoles) de BOC-D-O Ser y 9,0 g (20 mmoles) de Tir-Ser-Met-OCH₃ se disuelven en 30 ml de dimetilformamida. La disolución se enfría a 0°C, y se añaden 2,22 ml (20 mmoles) de N-metilmorfolina y 3,8 g (18,4 mmoles) de DCC. La mezcla de reacción se agita durante 1 hora a 0°C y se deja reposar durante la noche a temperatura ambiente. Después se separa por filtración el DCU formado, y se evapora el filtrado. El residuo se disuelve en 400 ml de acetato de etilo, la disolución se lava con 2 x 200 ml de ácido clorhídrico N, y con 2 x 200 ml de bicarbonato de sodio acuoso al 8%, se seca y se evapora. Se obtienen como residuo 8,10 g del éster de tetrapeptido sustituido protegido. Este residuo se disuelve en 85 ml de metanol, se añaden 2,2 ml (46 mmoles) de hidrato de hidrazida, y la disolución se deja reposar a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se elimina por destilación, y el residuo se tritura con acetato de etilo, se filtra, se lava con acetato de etilo y éter, y se seca en un desecador sobre ácido sulfúrico concentrado. Se obtienen 7,21 g (63%) de la hidrazida de tetrapéptido sustituido protegido; p. de f. 174-175°C (tras recristalización a partir de agua), R_f/1/ : 0,30.

Análisis: Calculado para C₂₅H₄₀N₆O₁₀S (616,69): C 48,7%; H 6,55%; N 13,6%



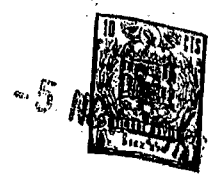
Encontrado: C 48, 3%; H 6,6%; N 13,8%

Operación 6: BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu(OBu^t)

-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli.ClH

5 1,25 g (2,13 mmoles) de BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-N₂H₃ se disuelven en 15 ml de dimetilformamida, y la disolución se enfría a -20°C. A la disolución agitada y enfriada se añaden, gota a gota, 2,08 ml (8,32 mmoles) de ácido clorhídrico en acetato de etilo 4N y 0,32 ml (2,70 mmoles) de nitrito de terc-butilo. La mezcla de reacción se agita
10 durante 5 minutos a -10°C, se enfría a -20°C, y se añade una disolución de 2,78 g de Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli y 1,4 ml (8,13 mmoles) de diisopropil
15 etilamina en 23 ml de dimetilformamida. La mezcla de reacción se agita durante una hora a -5 a 0°C, y se deja reposar a 0°C durante la noche. La disolución se evapora y el residuo se tritura con disolución acuosa de bicarbonato de sodio al 8%. Los sólidos se separan por filtración, se lavan con agua y se secan. Se obtienen 3,49 g (94%) del tetradecapéptido sustituido protegido.

20 Este producto se pone en suspensión en 24 ml de metanol, y la suspensión se añade a una mezcla de 4,75 ml de ácido clorhídrico concentrado y 4,75 ml de piridina. La disolución obtenida se diluye con 240 ml de agua, el precipitado formado se separa por filtración, se lava con
25 agua, y se seca. Se obtienen 2,95 g (73%) del clorhidrato



de tetradecapéptido sustituido protegido; p. de f.

200-202°C, $R_f/2/ = 0,25$

Operación 7: Oxalato de Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃

11,0 g (17,7 mmoles) de Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-

5 -OCH₃ (K. Hofman y otros: J. Am. Chem. Soc 86, 4991 /1964/)

se disuelven en 200 ml de metanol. Se añaden 2,0 g (22,2 mmoles) de ácido oxálico anhidro, y la mezcla se hidrogena en presencia de 2,0 g de catalizador de paladio sobre carbono al 10%. Cuando termina la reacción, el catalizador se separa por filtración, el filtrado se evapora, y

10 el residuo se tritura con éter. Se obtienen 9,1 g (89%) de oxalato de éster del dipéptido; p. de f. 65-67°C (tras recristalización a partir de una mezcla de isopropanol y éter diisopropílico). $R_f/2/ = 0,34$, $(\alpha)_D = + 3,79^\circ$ (c = 1, en metanol).

15

Análisis: Calculado para C₂₅H₄₆N₄O₁₁ (578,65) : C 51,9%; H 8,9%; N 9,7%

Encontrado: C 51,5%;

H 7,9%; N 9,9%

20 Operación 8: Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃

8,1 g (14,0 mmoles) de oxalato de Lis(BOC)-

-Lis(BOC)-OCH₃ se ponen en suspensión en 60 ml de acetato de etilo. Se añaden a la suspensión 3,1 ml (28,0 mmoles) de N-metilmorfolina y 6,7 g (14,0 mmoles) de Z-Lis

25 (BOC)-ONSu, y la mezcla se agita durante 2 horas a tempe



ratura ambiente . La mezcla espesa de reacción se dilu-
 ye con 200 ml de acetato de etilo y 40 ml de agua. Se se-
 para la fase acuosa, y la disolución orgánica se lava
 sucesivamente con 2 x 40 ml de ácido clorhídrico N y 2 x
 5 40 ml de disolución acuosa de bicarbonato de sodio al 8%.
 La disolución orgánica se seca sobre sulfato de sodio,
 se evapora, y el residuo se tritura con éter diisopropil-
 lico. El producto crudo obtenido se recristaliza a par-
 10 tir de una mezcla de isopropanol y éter diisopropílico.
 Se obtienen 8,0 g (67%) del éster metílico del tripépti-
 do protegido; p. de f. 117-118°C, $R_f/1/ = 0,58$, $(\alpha)_D =$
 $-17,47^\circ$ (c = 1, en metanol).

Análisis: Calculado para $C_{42}H_{70}N_6O_{12}$ (851,03) : C 59,3%;
 H 8,3%
 15 Encontrado C 59,7%;
 H 8,2%

Operación 9: BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu(OBu^t)-
 -His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis-(BOC)-Lis
 (BOC)-OCH₃.GLH

20 1,25 g de Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃ se
 disuelven en 25 ml de metanol, y la mezcla se hidrogena
 en presencia de 0,2 g de paladio sobre carbón al 10%. Cuan-
 do termina la reacción, el catalizador se separa por
 filtración, el disolvente se elimina por evaporación, y
 25 el éster de tripéptido residual y 2,42 g (1,24 mmoles)



de BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu-(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-
-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli. ClH se disuelven en 12 ml de di-
metilformamida. Se añaden a la disolución 0,97 g (3,64
mmoles) de PCPOH y 0,255 g (1,24 mmoles) de DCC, y la
5 mezcla se deja reposar a temperatura ambiente durante 2
días. Después, el DCU formado se separa por filtración,
el filtrado se concentra en vacío, y el producto se pre-
cipita añadiendo éter al concentrado. El producto se se-
para por filtración y se seca. Se obtienen 3,4 g de pro-
ducto crudo, p. de f. 177°C (con descomposición). Este
10 producto crudo se purifica por precipitación a partir de
metanol con éter, produciendo 2,6 g (80%) de clorhidrato
de éster metílico del heptadecapéptido sustituido prote-
gido; p. de f. 191°C (con descomposición), $R_f/3/ = 0,54$.

15 Operación 10: BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu(OBu^t)
-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)
-Lis(BOC)- N_2H_3

2,5 g (0,93 mmoles) de BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-
-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis
20 (BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)- OCH_3 . ClH se disuelven en 75 ml
de metanol caliente. La disolución se enfría a temperatu-
ra ambiente, se añaden a la disolución 0,91 ml (18,7 mmo-
les) de hidrato de hidrazida, y la mezcla se deja reposar
a temperatura ambiente durante dos días. Después, el me-
25 tanol se separa por destilación, y el residuo se tritura



con éter. Se obtienen 2,15 g de producto crudo; p. de f. 199°C (con descomposición). El producto crudo se purifica por precipitación a partir de dimetil formamida con agua. Se obtienen 2,00 g (81%) de la hidrazida de heptadecapéptido sustituido protegido; p. de f. 205°C (con descomposición), $R_f/3/ = 0,49$.

Operación 11: BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu-(OBu^t)
-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OLis/For/-NH₂.

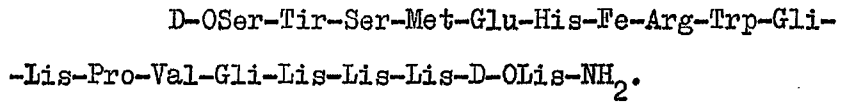
a) 0,57 g (1,97 mmoles) de BOC-OLis/For/-NH₂ se disuelven en 7,5 ml de ácido trifluoroacético. Después de 0,5 horas de reposo, la disolución se evapora en vacío, y el residuo se disuelve en 4 ml de dimetilformamida. La disolución se neutraliza con diisopropiletilamina.

b) 1,00 g (0,377 mmoles) de BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-N₂H₃ se disuelven en 5 ml de dimetilformamida, con calentamiento suave. La disolución se enfría a -20°C, y se le añaden gota a gota, con agitación, 0,54 ml (1,52 mmoles) de ácido clorhídrico 2,8 N en acetato de etilo y 0,05 ml (0,42 mmoles) de nitrito de terc-butilo, La mezcla de reacción se agita a -10°C durante 5 minutos, después se enfría a -20°C, y la disolución neutra trifluoroacetato de OLis/For/-NH₂, obtenida como se ha descrito anteriormente, se añade a la disolu-



oión juntamente con 0,2 ml (1,17 mmoles) de diisopropi-
letilamina. La mezcla de reacción se agita a -50°C duran-
te una hora, y se deja reposar a 0°C durante la noche.
Después se separa por destilación el 50% del disolvente,
5 y el concentrado se diluye con 20 ml de agua. La masa
que se separa solidifica por reposo. La sustancia obteni-
da se pulveriza bajo agua, se filtra y se seca. Se obtie-
nen 0,80 g (75,5%) de la amida de octadecapéptido susti-
tuído protegido; p. de f. 140-145°C, $R_f/3/ = 0,47$.

10 Ejemplo 2



0,75 g (0,267 mmoles) de BOC-D-OSer-Tir-Ser-
-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-
15 Lis-(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-D-OLis/For/-NH₂ se disuel-
ven en la mezcla de 6 ml de ácido trifluoroacético,
0,75 ml de agua y 0,75 ml de anisol; la disolución se
deja reposar durante una hora, y después se diluye con
150 ml de éter. El precipitado formado se separa por
20 filtración, se lava con éter, y se seca en un deseca-
dor a vacío sobre pentóxido de fósforo e hidróxido de
potasio. Los 0,65 g(80%) así obtenidos de trifluoroace-
tato de formil-octadecapéptido sustituido se disuelven
en 10 ml de agua, se añaden 0,25 ml de mercaptoetanol,
25 la disolución se neutraliza hasta pH = 5 con disolución



N de hidróxido de sodio, y después se añaden 10,6 ml de disolución de acetato de hidrazina 2M, y la mezcla se mantiene en un baño de agua a 95°C durante 2 horas. La mezcla se concentra en vacío, y el concentrado se vierte sobre una columna de cambiador de iones Whatman CM-52. La columna se eluye con un gradiente de tampón preparado con tampón de acetato de amonio 0,2 M (pH 6,7) y 0,5 M (pH 6,7), y se recogen las fracciones apropiadas y se liofilizan. Se obtienen 0,28 g (41%) de la amida de octadecapéptido sustituido. La amida de octadecapéptido sustituido protegido, usada como sustancia de partida, puede prepararse como sigue:

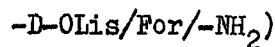
Operación 1: Acido D-alfa-terc-butoxicarbonil-aminooxi-epsilon-formilamino-caproico (BOC-D-OLis/For/).

Este compuesto se prepara a partir de N-epsilon-lon-formil-L-lisina como se ha descrito en el Ejemplo 1, Operación 1. P. de f. 114-116°C, $R_f/2/ = 0,31$, $(\alpha)_{D_20} = +58,6^\circ$ (c = 1, en metanol).

Análisis: Calculado para $C_{12}H_{22}N_2O_6$ (290,32): C 49,6%;
H 7,65%

Encontrado: C 50,0%;
H 7,6%

Operación 2: Amida de ácido D-alfa-terc-butoxicarbonil-aminooxi-epsilon-formilamino-caproico (BOC-



5 Este compuesto se prepara a partir de 5,0 g (17,2 mmoles) de BOC-D-OLis/For/ como se ha descrito en el Ejemplo 1, Operación 2. Se obtienen 4,4 g (88%) del producto deseado, R_f/2/ = 0,54.

Operación 3: BOC-D-Tir-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-D-OLis/For/-NH₂

10 Este compuesto se prepara a partir de 0,57 g (1,97 mmoles) de BOC-D-OLis/For/-NH₂ como se ha descrito en el Ejemplo 1, Operación 11. Se obtienen 0,90 g (85%) de la amida de octadecapéptido sustituido protegido; p. de f. 140-145°C, R_f/3/ = 0,47.

Ejemplo 3

15 H-D-Oser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Lis-Oli-sNH₂

20 1,2 g (0,417 milimoles) de BOC-D-Oser-Tir-Ser-Met-Glu-(Obu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OLis(BOC)-NH₂ son disueltos en una mezcla de 9,6 ml de ácido trifluoroacético, 1,2 ml de agua y 1,2 ml de anisol. La solución es dejada reposar durante una hora y luego es diluída con 240 ml de éter. El precipitado separado es aislado por filtración, lavado con éter y secado en vacío sobre pentóxido de fósforo e hidróxido de potasio. Se obtienen 1,10 g (84%) de

25

16 DIC 1975

trifluoroacetato de amida de octadecapeptido sustituido con ácido aminooxacarboxílico. El trifluoroacetato bruto es disuelto en 20 ml de agua y los iones trifluoroacetato son intercambiados por iones acetato mediante un intercambiador de iones cíclico con acetato de la marca Dowex 1 x 8 (firma Röhm und Haas). Después de ello la solución obtenida de este modo es aplicada sobre una columna (4,5 x 65 cm) rellena con intercambiador de iones de la marca Whatman CM-52. Se eluye con un gradiente de tampón lineal preparado a base de 2 litros de tampón de acetato de amonio 0,2 M (pH = 6,7) y 2 litros de tampón de acetato de amonio 0,5 M (pH = 6,7) con una velocidad de 80 ml/hora, se recogen las fracciones 98-115 que contienen el producto y se las liofiliza. Se obtienen 0,49 g (41%) de amida de octadecapeptido sustituido con ácido aminooxacarboxílico. Contenido de péptido : 78% (en el espectro de U.V.) contenido de Met-sulfóxido : 2,3%; proporción Tir/Trp : 1,10.

Análisis de aminoácidos: Lis 3,5 /4/, His 0,9 /1/, Arg 1,0 /1/, Ser 0,85 /1/, Glu 1,0 /1/, Pro 1,0 /1/, Gly 1,9 /2/, Val 0,9 /1/, Met 0,7 /1/, Tir 0,9 /1/, Fe 1,0 /1/:
 $R_F^5 = 0,18$.

La amida octadecapeptido sustituido con ácido aminooxacarboxílico y protegido, utilizada como sustancia de partida es preparada del siguiente modo:

Operación 1: Sal de dicitclohexilamina de ácido L-alfa-
-terc.-butiloxicarbonilaminooxi-epsilon-benciloxi-car-
bonil-amino-caproico (BOC-OLis/Z/-OH.DCHA).

5 Del modo descrito en la Operación 1 del Ejem-
plo 1 se prepara a partir de N-epsilon-benciloxicarbonil-
-D-lisina. El ácido L-alfa-terc.-butiloxicarbonil-amino
oxi-epsilon-benciloxicarbonil-amino-caproico oleoso obte-
nido es disuelto en éter y hecho reaccionar con dicitclo-
hexilamina para formar la sal de dicitclohexilamina. Pun-
10 to de fusión: 158-161°C (recristalizado en mezcla de eta-
nol-agua); $R_F^1 = 0,15$; $[\alpha]_D^{25} = -34,6^\circ$ (c = 1, en etanol).

Operación 2: Amida de ácido L-alfa-terc.butiloxicarbonil-
-aminooxi-epsilon-benciloxi-carbonil-amino-caproico (BOC-
-OLis/Z/-NH₂).

15 La sal de dicitclohexilamina de ácido L-alfa-
-terc.-butiloxicarbonil-aminooxi-epsilon-benciloxicarbo-
nil-amino-caproico es extraída por agitación con éter y
ácido sulfúrico 1 N y la solución etérea es concentrada
por evaporación. El ácido obtenido es transformado en
20 amida del modo descrito en la Operación 2 del Ejemplo 1.
Tras concentrar por evaporación la mezcla de reacción, el
producto bruto es disuelto en acetato de etilo, en lugar
de ser purificado por cromatografía en columna, y es la-
vado con agua, con ácido sulfúrico 1 N y finalmente con
25 solución al 8% de bicarbonato de sodio. Después de ello,



la fase en acetato de etilo es concentrada por evaporación. Se obtiene la amida de ácido L-alfa-terc.-butiloxycarbonil-aminooxi-epsilon-benciloxycarbonil-aminocaproico en forma de un aceite espeso. Punto de fusión: 5 93-95°C (recristalizado en mezcla de metanol y agua); $R_f^1 = 0,42$; $[\alpha]_D^{25} = -27,5^\circ$ (c=1, en metanol).

Operación 3: Oxalato de amida de ácido L-alfa-terc.-butiloxycarbonil-aminooxi-epsilon-amino-caproico (BOC-OLis-NH₂.oxalato).

10 12,0 g (30,4 moles) de BOC-OLis/Z/-NH₂ son disueltos en 240 ml de metanol, mezclados con 3,0 g (33,3 milimoles) de ácido oxálico anhidro e hidrogenados en presencia de 2,0 g de catalizador de paladio al 10% sobre carbón activo. Una vez terminada la reacción se separa por filtración el catalizador, el producto filtrado 15 es concentrado por evaporación y el residuo es triturado con éter. Después de recristalización del oxalato bruto (9,3 g) en una mezcla de 45 ml de metanol y 95 ml de éter se obtienen 8,7 g (81,5%) de oxalato de amida de ácido 20 L-alfa-terc.-butiloxycarbonil-aminooxi-epsilon-amino-caproico. Punto de fusión: 153-155°C, $R_f^3 = 0,30$; $[\alpha]_D^{25} = -38,1^\circ$ (c= 1, en metanol).

Operación 4: Amida de ácido L-alfa-aminooxi-epsilon-terc.-butiloxycarbonil-amino-caproico (H-OLis(BOC)-NH₂).

25 8,0 g (22,8 milimoles) de BOC-OLis-NH₂.oxalato son disueltos en 40 ml de ácido trifluoroacético y la so-



lución, después de media hora, es concentrada por evaporación bajo presión reducida. El residuo oleoso es lavado con éter recambiado, después de ello con 24 ml de dioxano y se añade una cantidad tal de hidróxido de sodio 2 N que resulta una lejía débil (pH = 8-9). Tras añadir 6,6 g (45,6 milimoles) de azida de terc.-butiloxycarbonilo y 2,3 g (57,5 milimoles) de óxido de magnesio, la mezcla de reacción es agitada a la temperatura ambiente durante 16 horas, después de ello la parte sólida es separada por filtración, y el producto filtrado es concentrado por evaporación. El residuo es disuelto en 50 ml de agua y extraído por agitación tres veces con 70 ml de acetato de etilo. Tras concentrar por evaporación las fases en acetato de etilo, el residuo es triturado con éter, separado por filtración, y después de ello el producto bruto (6,35 g) es recristalizado en acetato de etilo. Se obtienen 3,6 g (60,5%) de amida de ácido L-alfa-aminooxi-epsilon-terc.-butiloxycarbonil-amino-caproico. Punto de fusión: 118-120°C.; $R_D^A = 0,30$; $[\alpha]_D^{25} = -39,5^\circ$ (c=1, en metanol).

Operación 5: Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-N₂H₃
 25,15 g (29,5 milimoles) de Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃ son disueltos en 500 ml de metanol e hidrogenados en presencia de 5,0 g de catalizador de paladio al 10% sobre carbón activo. Tras haber transcurrido la

14.12.75



reacción el catalizador es separado por filtración,
el producto filtrado es concentrado por evaporación
y el residuo es disuelto en 180 ml de diclorometano.
La solución es mezclada con 5,72 g (41,0 milimoles)
5 de trietilamina y 10,26 g (36,8 milimoles) de cloruro
de tritilo. La mezcla de reacción es dejada reposar a
la temperatura ambiente durante 16 horas, luego el di
solvente es separado por destilación y el residuo es
disuelto en 300 ml de acetato de etilo. La solución es
10 extraída por agitación con 50 ml de agua, tres veces
con 50 ml de solución al 5% de ácido cítrico y tres ve
ces con 50 ml de solución al 8% de bicarbonato de so
dio, luego es secada y finalmente concentrada por eva
poración. El residuo es pulverizado bajo éter de pe
15 tróleo. Después de la filtración y el secado se obtienen
28,0 g de Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃ bruto. La
sustancia bruta es disuelta en 170 ml de metanol sin
purificación adicional, se añaden 7,25 ml (150 milimo
les) de hidrato de hidrazina y se deja reposar a la tem
20 peratura ambiente la mezcla de reacción. Después de tres
días el metanol es separado por filtración y el residuo
es triturado con éter. El producto bruto (17,65 g) es re
cristalizado en una mezcla de 35 ml de metanol y 350 ml
de éter. Se obtienen 13,85 g (49%) de hidrazida de te
25 tra-peptido protegido. Punto de fusión: 197-199°C.; $R_f^1 =$
0,13; $[\alpha]_D = -7,1^\circ$ (c=1, en metanol).



Operación 6: Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OLis(BOC)-
-NH₂

5 4,1 g (4,27 milimoles) de Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-Lis(BOC)-N₂H₃ son disueltos en 14 ml de dimetilformami-
da. La solución es enfriada a -20°C y, con agitación,
se añaden gota a gota primero 6,5 ml (17,0 milimoles) de
solución 2,6 N de ácido clorhídrico en acetato de etilo
y luego 0,65 ml (5,45 milimoles) de nitrito de terc.-bu-
tilo. La mezcla de reacción es agitada a -10°C durante
10 5 minutos, luego es enfriada a -20°C y la solución de
1,42 g (5,45 milimoles) de H-OLis(BOC)-NH₂ y 2,2 ml
(12,8 milimoles) de diisopropiletilamina en 7 ml de di-
metilformamida. La mezcla de reacción es agitada duran-
te una hora entre -5°C y 0°C y luego se deja reposar a
15 0°C hasta el día siguiente. Después de ello la solución
es concentrada por evaporación, el residuo es disuelto
en 140 ml de acetato de etilo y la solución es extraída
por agitación con 40 ml de agua, tres veces con 40 ml de
solución al 5% de ácido cítrico, y luego dos veces con
20 40 ml de solución al 8% de bicarbonato de sodio. Después
del secado, el acetato de etilo es separado por destila-
ción y el residuo sólido es triturado con éter. Después
de separar por filtración y secar se obtienen 2,75 g
(54%) de amida de tetrapéptido sustituido con ácido ami-
25 nooxicarboxílico y protegido. Punto de fusión: 137-140°C;



$R_f^1 = 0,26$; $[\alpha]_D = -24,4^\circ$ (c = 1, en metanol).

Operación 7: H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OLis(BOC)-
-NH₂HCl

5 5,0 g (4,22 milimoles) de Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-Lis(BOC)-OLis(BOC)-NH₂ son disueltos en 50 ml de metanol
y mezclados con una solución de clorhidrato de piridina
obtenida a partir de 1,7 ml de piridina y 1,7 ml de ácido
clorhídrico concentrado. La mezcla de reacción es dejada
reposar a la temperatura ambiente durante 20 horas, lue-
10 go el metanol es separado por destilación y la masa espe-
sa remanente es amasada a fondo con 150 ml de agua, des-
pués de haber decantado el agua en vacío se seca y se pul-
veriza bajo éter. Después de separar por filtración y se-
car se obtienen 3,7 g (82%) de H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis
15 (BOC)-OLis(BOC)-NH₂.HCl. Punto de fusión : 120-123°C;
 $R_f^3 = 0,72$; $[\alpha]_D = + 17^\circ$ (c = 1, en metanol).

Operación 8: BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-
-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-
-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OLis(BOC)-NH₂.

20 0,9995 g (0,5 milimoles) de BOC-D-OSer-Tir-Ser-
-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-
-OH.HCl, 0,491 g (0,5 milimoles) de H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-Lis(BOC)-OLis(BOC)-NH₂.HCl y 0,800 g (3,0 milimoles) de
PCPOM son disueltos en 5 ml de dimetilformamida, y prime-
25 ro se añaden 0,055 ml (0,5 milimoles) de N-metilmorfolina,

16 DIC. 1975

y luego 0,210 g (1,0 milimoles) de DCC. La mezcla de reacción es dejada reposar a la temperatura ambiente durante un día, luego el DCU es separado por filtración y el producto filtrado es diluido con 100 ml de éter. El producto separado es aislado por filtración, lavado con éter y secado. Se obtienen 1,30 g (90%) de amida de octadecapéptido sustituido con ácido aminooxicarboxílico y protegido. $R_f^6 = 0,50$.

Ejemplo 4

10 D-Oser-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Lis-D-OLis-NH₂.

1,2 g (0,417 milimoles) de BOC-D-Oser-Tir-Ser-Met-Glu-(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis-(BOC)-Lis-(BOC)-Lis(BOC)-D-OLis(BOC)-NH₂ son disueltos en una mezcla de 9,6 ml de ácido trifluoroacético, 1,2 ml de agua y 1,2 ml de anisol. La solución es dejada reposar durante una hora y después de ello diluida con 240 ml de éter. El precipitado separado es aislado por filtración, lavado con éter y secado en vacío sobre pentóxido de fósforo e hidróxido de potasio. Se obtienen 1,05 g (80%) de trifluoroacetato de amida de octadecapéptido sustituido. El trifluoroacetato bruto es disuelto en 20 ml de agua y los iones trifluoroacetato son intercambiados por iones acetato mediante intercambiador de iones cíclico con acetato de la marca Dowex 1 x 8 (fir-



ma Röhm und Haas). Después de ello la solución obtenida de este modo es aplicada sobre una columna (4,5 x 65 cm) rellena con intercambiador de iones de la marca Whatman CM-52. Se eluye con un gradiente de tampón lineal preparado a partir de 2 litros de tampón de acetato de amonio 0,2 M (pH = 6,7) y 2 litros de tampón de acetato de amonio 0,5 M (pH = 6,7) con una velocidad de 80 ml/hora, se recogen las fracciones 103-112 que contienen el producto y se las liofiliza. Se obtienen 0,42 g (37%) de amida de octadecapéptido sustituido con ácido aminooxicarboxílico. Contenido de péptido : 82% (en el espectro de UV); contenido de Met-sulfóxido : 1,8%; proporción Tir/Trp : 1,07.

Análisis de aminoácidos: Lis 3,4 /4/, His 1,0 /1/, Arg 0,9 /1/, Ser 0,8 /1/, Glu 0,9 /1/, Pro 1,0 /1/, Gli 2,05 /2/, Val 0,9 /1/, Met 0,75 /1/, Tir 0,9 /1/, Fe 1,0 /1/; $R_f^5 = 0,18$.

La amida de octadecapéptido sustituido con ácido aminooxicarboxílico y protegido, es preparada del siguiente modo:

Operación 1: Sal de dicitclohexilamina de ácido D-alfa-terc.-butiloxicarbonil-aminoxí-epsilon-benciloxicarbonil-amino-caproico (BOC-D-O_Lis/Z/-OH.DCHA).

Del modo descrito en la Operación 1 del Ejem-



plo 1, se prepara a partir de N-epsilon-benciloxicar
bonil-L-lisina. El ácido D-alfa-terc.-butiloxicarbonil-
-aminooxi-epsilon-benciloxicarbonil-amino-caproico oleoso
obtenido es disuelto en éter y hecho reaccionar con di-
5 ciclohexilamina para formar la sal de dicitclohexilamina.
Punto de fusión 159-162°C (recristalizado en mezcla de
etanol-agua); $R_f^1 = 0,15$; $[\alpha]_D = + 35,4^\circ$ (c = 1, en eta
nol).

Operación 2: Amida de ácido D-alfa-terc.-butiloxicarbo
10 nil-aminooxi-epsilon-benciloxicarbonil-
-amino-caproico (BOC - D-OLis/Z/-NH₂).

Del modo descrito en la Operación 2 del Ejemplo
3, se prepara a partir de la sal de dicitclohexilamina de
ácido D-alfa-terc.-butiloxicarbonil-aminooxi-epsilon-ben-
15 ciloxicarbonil-amino-caproico. $R_f^1 = 0,42$; punto de fu-
sión: 95-97°C, $[\alpha]_D = + 28,9^\circ$ (c = 1, en metanol).

Operación 3: Oxalato de amida de ácido D-alfa-terc.-
-butiloxicarbonil-aminooxi-epsilon-amino-
-caproico (BOC--D-OLis-NH₂.oxalato).
20

Del modo descrito en la Operación 3 del Ejem-
plo 3, se prepara a partir de amida de ácido D-alfa-terc.-
-butiloxicarbonil-aminooxi-epsilon-benciloxicarbonil-ami-
no-caproico. Punto de fusión: 155-157°C.; $R_f^3 = 0,30$;
25 $[\alpha]_D = + 39,0^\circ$ (c = 1, en metanol).



197

Operación 4: Amida de ácido D-alfa-aminooxi-epsilon-
-terc.-butiloxicarbonil-amino-caproico
(N-D-OLis(BOC)-NH₂).

5 Del modo descrito en la Operación 4 del Ejem-
plo 3 se prepara a partir de oxalato de amida de ácido
D-alfa-terc.-butiloxicarbonil-aminooxi-epsilon-amino-
-caproico. Punto de fusión: 118-120°C.; $R_F^4 = 0,28$;
 $[\alpha]_D^{25} = + 40,42$ (c = 1, en metanol).

Operación 5: Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-D-OLis(BOC)-
10 -NH₂.

Del modo descrito en la Operación 6 del Ejem-
plo 3, se prepara a partir de 8,7 g (1,0 milimoles) de
Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-N₂H₃ y 3,0 g (11,5 mili-
moles) de H-D-OLis(BOC)-NH₂. Tras concentrar por evapo-
15 ración la fase en acetato de etilo, el producto bruto
remanente es aplicado sobre una columna de gel de sílice
con 20 ml de una mezcla de acetato de etilo: (piridina:
ácido acético: agua = 20:6:11) = 99:1 y es cromatogra-
fiado. El eluato es recogido en fracciones cada una de
20 15 ml y se investiga su composición mediante cromatogra-
fía en capa delgada. Las fracciones 85-192 que contienen
el producto puro son recogidas y el disolvente es sepa-
rado por destilación. Se obtienen 3,70 g (34,5%) de ami-
da de tetrapéptido sustituido con ácido aminooxicarbo-
25 xílico, y protegido. Punto de fusión: 132-136°C;
 $R_F^1 = 0,23$.

18/12/75

Operación 6: H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-D-OLis(BOC)-
-NH₂-HCl

5 2,0 g (2,10 milimoles) de Tri-Lis(BOC)-Lis
(BOC)-Lis(BOC)-D-OLis(BOC)-NH₂ son disueltos en 20 ml
de ácido acético al 80%. La solución es dejada reposar
a la temperatura ambiente durante 20 minutos, luego es
concentrada por evaporación y el residuo es triturado
con éter. El acetato de amida de tetrapéptido sustitui-
do con ácido aminooxicarboxílico obtenido de este modo
10 (1,68 g; punto de fusión: 94-95°C), es disuelto en 17
ml de metanol, luego se añade solución de clorhidrato
de piridina, obtenida mezclando 1,35 ml de piridina
con 1,35 ml de ácido clorhídrico concentrado, y el me-
tanol es separado por destilación. El residuo es tritu-
15 rado con 50 ml de agua. Después de filtrar, lavar con
agua y secar se obtienen 1,2 g (72%) de H-Lis(BOC)-Lis
(BOC)-Lis(BOC)-D-OLis(BOC)-NH₂.HCl. Punto de fusión:
122-125°C; R_f³ = 0,70.

20 Operación 7: BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu-(OBu^t)-His-Fe-
-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)
-Lis(BOC)-D-OLis(BOC)-NH₂

25 0,995 g (0,5 milimoles) de BOC-D-OSer-Tir-
Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-
Gli-OH.HCl, 0,491 g (0,5 milimoles) de H-Lis(BOC)-Lis-



(BOC)-D-OLis(BOC)-NH₂.HCl y 0,800 g (3,0 milimoles) de PCPOH son disueltos en 5,0 ml de dimetilformamida y se añaden primero 0,055 ml (0,5 milimoles) de N-metilmorfolina, y luego 0,210 g (1,0 milimoles) de DCC. La mezcla de reacción es dejada reposar a la temperatura ambiente durante un día, luego es separado por filtración el DCU y el producto filtrado es diluido con 100 ml de éter. El producto es aislado por filtración, lavado con éter y secado. Se obtienen 1,40 g (97%) de amida de cotadecapéptido sustituido con ácido aminooxicarboxílico y protegido. Punto de fusión: 170-178°C; R_F⁶ = 0,52.

Ejemplo 5

H-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Lis-Lis-OGli-NH₂.

0,400 g (0,134 milimoles) de BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OGli-NH₂.HCl son disueltos en una mezcla de 3,2 ml de ácido trifluoroacético, 0,4 ml de anisol y 0,4 ml de agua. La solución es dejada reposar durante una hora, luego es diluida con 80 ml de éter y el precipitado separado es aislado por filtración. El trifluoroacetato de amida de nonadecapéptido es disuelto en 5 ml de agua y cromatografiado sobre una columna (3,5 x 56 cm) rellena con intercambiador de iones de carboximetilcelulosa (Whatman



CM-52) con un gradiente de tampón lineal preparado a partir de 1,5 litros de tampón 0,2 M (pH = 6,7) y 1,5 litros de tampón 0,6 M (pH = 6,7). Las fracciones 78-86 que contienen el producto son recogidas y liofilizadas. Se obtienen 0,166 g (41,5%) de amida de nonadecapéptido sustituido con ácido aminooxicarboxílico. $R_f^5 = 0,22$; contenido de péptido : 76%; contenido de metionina sulfóxido : 2,3%; Análisis de aminoácidos: Lis 4,5 /5/, His 1,0 /1/, Arg 0,9 /1/, Ser 0,85 /1/, Glu 1,0 /1/, Pro 1,0 /1/, Gli 1,9 /2/, Val 0,85 /1/, Met 0,75 /1/, Tir 0,95 /1/, Fe 1,0 /1/.

El clorhidrato de amida nonadecapéptido sustituido con ácido aminooxicarboxílico y protegido, es preparado del siguiente modo:

Operación 1: Z-Lis-(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃.

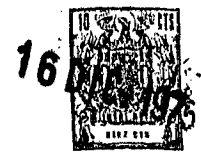
51 g (60 milimoles) de Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃ son disueltos en 100 ml de metanol e hidrogenados en presencia de 10 g de catalizador de paladio al 10% sobre carbón activo. Una vez terminada la reacción el catalizador es separado por filtración y la solución es concentrada por evaporación en vacío. El residuo es disuelto en 240 ml de acetato de etilo, se añaden 28,5 g (60 milimoles) de Z-Lis(BOC)-OSu y se deja reposar a la temperatura ambiente. Después de dos horas se añaden a la mezcla de reacción 1.000 ml de acetato de

16 DEC 1975

etilo y 200 ml de agua. Después de agitar a fondo, la fase acuosa es separada y la fase en acetato de etilo es lavada dos veces con 200 ml de ácido clorhídrico 1 N, dos veces con 200 ml de solución al 8% de bicarbonato de sodio, y después del secado es concentrada por evaporación. El residuo es triturado con éter, se separado por filtración y lavado con éter. El producto bruto es recristalizado en acetato de etilo. Se obtienen 52,05 g (81%) de Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃. Punto de fusión: 122-123°C.

Operación 2: H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃.

35 g (32,4 milimoles) de Z-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃ son disueltos en 700 ml de metanol y son hidrogenados en presencia de 7 g de catalizador de paladio al 10% sobre carbón activo. Una vez terminada la reacción, el catalizador es separado por filtración, la solución es concentrada por evaporación y el residuo es estabilizado con una mezcla de éter y diisopropiléter. Después de la filtración y del secado el producto bruto es recristalizado en una mezcla de éter y diisopropiléter. Se obtienen 24,8 g (81%) de H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃. Punto de fusión 101-103°C.



Operación 3: Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-OCH₃.

5 24 g (25,4 milimoles) de H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃ y 4,7 ml (33,6 milimoles) de
trietilamina son disueltos en 180 ml de diclorometano,
se añaden 8,5 g (30,5 milimoles) de cloruro de tritilo
y se deja reposar a la temperatura ambiente. Después de
24 horas el diclorometano es separado por destilación
10 y al resto se añaden 500 ml de acetato de etilo y 100
ml de agua. Después de agitar a fondo, la fase acuosa
es separada y la fase en acetato de etilo es extraída
por agitación tres veces con 100 ml de ácido cítrico
al 5% y tres veces con 100 ml de solución al 8% de bi-
15 carbonato de sodio, es secada y luego concentrada por
evaporación. El resto es triturado con éter, separado
por filtración, y lavado con diisopropiléter y éter de
petróleo. Se obtienen 23,6 g (78,5%) de Tri-Lis(BOC)-
-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃. Punto de fusión: 166-168°C.

20 Operación 4: Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-N₂H₃.

25 23,3 g (19,6 milimoles) de Tri-Lis(BOC)-Lis
(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OCH₃ son disueltos en 230 ml
de metanol, se añaden 5,7 ml (117 milimoles) de hidra-
to de hidrazina y se deja reposar a la temperatura am-



biente. Después de cuatro días, el metanol es separado por destilación, el residuo es triturado con éter, separado por filtración y secado en vacío. Se obtienen 23,0 g (98%) de Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
5 -N₂H₃. Punto de fusión: 217-219°C.

Operación 5: Tri-Lis-(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-OGLi-NH₂.

2,37 g (2,0 milimoles) de Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-N₂H₃ son disueltos en 12 ml de
10 dimetilformamida. La solución es enfriada a -20°C, y, con agitación, se añaden gota a gota primero 2 ml (8,0 milimoles) de solución de ácido clorhídrico en acetato de etilo 4 N y luego 0,28 ml (2,35 milimoles) de nitrato de terc.-butilo. La mezcla de reacción es mantenida
15 a 10°C durante 5 minutos y luego enfriada a -20°C, y se añaden 0,216 g (2,4 milimoles) de H-OGLi-NH₂ [Riedl, Frank. Monatshefte 92 730 /1961/7] y 1,03 ml (6,0 milimoles) de diisopropiletilamina en 8,0 ml de dimetilformamida. La mezcla de reacción es dejada reposar durante
20 te 2 horas a -5 hasta 0°C y luego a 0°C hasta el día siguiente. Después de ello la solución es concentrada por evaporación, el residuo es triturado con agua, separado por filtración y lavado con agua. Se obtienen
25 2,35 g (94%) de Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-OHLi-NH₂. R_f⁴ = 0,72.



Operación 6: H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-OGLi-NH₂.HCl.

5 1,75 g (1,4 milimoles) de Tri-Lis(BOC)-Lis
(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OHLi-NH₂ son disueltos en 35
ml de ácido acético acuoso al 80%. La solución, des-
pués de una hora, es concentrada por evaporación y el
residuo es triturado con éter. Después de la filtra-
ción, del lavado con éter y del secado, el producto
bruto es aplicado con una mezcla de acetato de etilo-
10 -(piridina:ácido acético:agua = 20:6:11) en la propor-
ción 4:1 sobre una columna de gel de sílice (3,2 x 52
cm) y es cromatografiado. El eluato es recogido en
fracciones, cada una de 15 ml, y se determina su com-
posición mediante cromatografía en capa delgada. Las
15 fracciones 105-112 que contienen el producto bruto pu-
ro son recogidas, el disolvente es separado por desti-
lación, el residuo es triturado con éter, separado por
filtración y, después del secado, disuelto en 20 ml de
20 metanol. La solución es añadida a una solución de clor-
hidrato de piridina, obtenida mezclando 0,22 ml de pi-
ridina y 0,22 ml de ácido clorhídrico concentrado. Des-
pués de ello, el metanol es separado por destilación,
el residuo es triturado con éter, separado por filtra-
ción y secado en vacío. Se obtienen 0,95 g (65%) de
25 H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OHLi-NH₂.HCl.



$$R_F^2 = 0,18.$$

Operación 7: BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-
-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Gli-Lis(BOC)-
-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OGli-NH₂.HCl

5

0,398 g (0,20 milimoles) de BOC-D-OSer-Tir-
-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-OH.HCl, 0,208 g
(0,20 milimoles) de H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis
(BOC)-OGli-NH₂.HCl y 0,165 g (0,90 milimoles) de pen-

10

tafluorofenol son disueltos en 4 ml de dimetilformami-
da y se añaden primero 0,22 ml (0,20 milimoles) de N-
-metilmorfolina y luego 0,063 g (0,30 milimoles) de
DCC. La mezcla de reacción es dejada reposar durante

15

16 horas a la temperatura ambiente, luego se separa por
filtración el DCU y el producto filtrado es diluido con
éter. El producto separado es aislado por filtración,
lavado con éter y secado en vacío. Se obtienen 0,540 g
(91%) de clorhidrato de amida de nonadecapéptido pro-
tegido. $R_F^6 = 0,63$.

20

Ejemplo 6:

H-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Trp-Glu-
Lis-Pre-Val-Gli-Lis-Lis-Lis-Lis-OGli-Bzl

0,400 g (0,130 milimoles) de BOC-D-OSer-Tir-
-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-
Gli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OHli-OBzl.HCl

25



son disueltos en una mezcla de 3,2 ml de ácido trifluoro acético, 0,4 ml de anisol y 0,4 ml de agua. La solución, después de una hora, es mezclada con 80 ml de éter y el precipitado separado es aislado por filtración. El tri-
5 fluoroacetato de amida de nonadecapéptido bruto es disuelto en 5 ml de agua y la solución es cromatografiada sobre una columna (3,5 x 52 cm) rellena con un intercambiador de iones de carboximetilcelulosa (Whatman CM-52) con un gradiente de tampón lineal preparado a partir de 1,5 litros de tampón 0,2 M (pH = 6,7) y 1,5 litros de tampón 0,6 M (pH = 6,7). Las fracciones 80-93 que contienen el producto son recogidas y liofilizadas. Se obtienen 0,151 g (39%) de amida de nonadecapeptido sustituido con ácido aminooxicarboxílico. $R_f^5 = 0,28$;
10 contenido de péptido : 80%; contenido de metioninsulfóxido: 1,9%; Proporción Tir/Trp : 1,05;
Análisis de aminoácidos: Lis 4,5 /5/, His 0,95 /1/, Arg 1,0 /1/, Ser 0,8 /1/, Glu 1,0 /1/, Pro 1,0 /1/, Gli 1,95 /2/, Val 0,95 /1/, Met 0,8 /1/, Tir 0,95 /1/, Fe 1,0 /1/.
20

El clorhidrato de amida de nonadecapéptido sustituido con ácido aminooxicarboxílico y protegido, utilizado como sustancia de partida, es preparado del siguiente modo:

25



Operación 1: BOC-OGli-OBzl.

3,8 g (20 milimoles) de BOC-OGli-OH (memoria de patente húngara 165.117) son disueltos en 5 ml de dimetilformamida y se añaden 4,44 ml (40 milimoles) de trietilamina y 7,8 ml (66 milimoles) de bromuro de bencilo. La mezcla de reacción es calentada en baño María caliente durante 8 horas y luego es dejado reposar a la temperatura ambiente hasta el siguiente día. Después la mezcla de reacción es diluida con 100 ml de acetato de etilo y lavada con 50 ml de agua y tres veces con 20 ml de solución al 8% de bicarbonato de sodio. Después del secado, el acetato de etilo es separado por destilación y el residuo es recristalizado en éter. Se obtienen 4,5 g (80%) de BOC-OGli-OBzl. Punto de fusión 79-80°C.

Operación 2: H-OGli-OBzl.HCl.

11,2 g (40 milimoles) de BOC-OGli-OBzl son disueltos en 22 ml de acetato de etilo y se añaden 22 ml de solución de ácido clorhídrico 4 N en acetato de etilo. Después de 30 minutos, la mezcla de reacción es concentrada por evaporación y el residuo es triturado con éter. Después de la filtración y del secado, el producto bruto es recristalizado en acetato de etilo. Se obtienen 5,7 g (66%) de OGli-OBzl.HCl. Punto de fusión: 85-87°C.



Operación 3: Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-OGli-OBzl

5 7,11 g (6,0 milimoles) de Tri-Lis(BOC)-Lis
(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-N₂H₃ son disueltos en 36 ml
de dimetilformamida. A la solución enfriada a -20°C se
añaden gota a gota, con agitación, primero 6 ml (24 mi-
limoles) de solución de ácido clorhídrico 4 N en aceta-
to de etilo, y luego 0,84 ml (7,1 milimoles) de nitri-
to de terc.-butilo. La mezcla de reacción es mantenida
10 a -10°C durante 5 minutos, luego es enfriada a -20°C y
se añade una mezcla de 1,45 g (6,6 milimoles) de H-
-OGli-OBzl.HCl y 4,24 ml (24,6 milimoles) de diisopro-
piletilamina en 24 ml de dimetilformamida. La mezcla de
reacción es agitada durante 2 horas a una temperatura
15 de -5 a 0°C y luego es dejada reposar a 0°C hasta el
día siguiente. Luego la solución es concentrada por eva-
poración, el residuo es triturado con agua, separado
por filtración y lavado con agua. El producto bruto es
recristalizado en una mezcla de metanol-agua (1:1). Se
20 obtienen 6,95 g (87%) de Tri-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-Lis(BOC)-OGli-OBzl. $R_f^4 = 0,85$.

Operación 4: H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OGli-
-OBzl.HCl.

25 1,87 g (1,4 milimoles) de Tri-Lis-(BOC)-Lis



(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OGli-OBzl son disueltos en 37 ml de ácido acético acuoso al 80%. La solución es concentrada por evaporación después de una hora y el residuo es triturado con éter. Después de la filtración, del lavado con éter y del secado, el producto bruto es aplicado con una mezcla de acetato de etilo-(piridina:ácido acético:agua = 20:6:11) en la proporción 4:1 sobre una columna de gel de sílice (3,2 x 49 cm) y es cromatografiado. El eluato es recogido en fracciones cada una de 15 ml y se determina su composición por cromatografía en capa delgada. Las fracciones 83-97 que contienen el producto puro son recogidas, el disolvente es separado por destilación y el residuo es triturado con éter, después de la filtración y del secado es disuelto en 20 ml de metanol y se añade una solución de clorhidrato de piridina. Esta solución es obtenida de antemano a partir de 0,22 ml de piridina y 0,22 ml de ácido clorhídrico concentrado. Después de ello se separa el metanol por destilación, el residuo se tritura con éter, se separa por filtración y se seca en vacío. Se obtienen 0,905 g (57%) de H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OGli-OBzl.HCl. $R_F^2 = 0,23$.

Operación 5: BOC-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu(Obu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis(BOC)-Pro-Val-Cli-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-OGli-OBzl.HCl.



0,398 g (0,20 milimoles) de BOC-D-OSer-Tir-
-Ser-Met-Glu(OBu^t)-His-Fe-Arg-Trp-Gli-OH.HCl, 0,226 g
(0,20 milimoles) H-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-Lis(BOC)-
-OGli-OBzl.HCl y 0,165 g (0,90 milimoles) de pentafluoro
5 fenol son disueltos en 4 ml de dimetilformamida y se añ
den primero 0,022 ml (0,20 milimoles) de N-metilmorfo-
lina, luego 0,063 g (0,30 milimoles) de DDC. La mezcla
de reacción es dejada reposar a la temperatura ambiente,
luego el DCU es separado por filtración y el producto
10 filtrado es diluido con éter. El producto separado es
aislado por filtración, lavado con éter y secado en va-
cío. Se obtienen 0,502 g (82%) de clorhidrato de amida
de nonadecapéptido protegido. $R_f^6 = 0,68$.

La presente solicitud, que corresponde a la
15 presentada en Hungría, el 25 de Agosto de 1.972, bajo
el número RI-481, se acoge a los beneficios del artícu-
lo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

20

25

14.12.75



REIVINDICACIONES

5 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10 1ª.- Un procedimiento de preparación de nuevos péptidos de la fórmula general I con efecto ACTH

H-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu-His-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-(Lis)_n-X

15 en donde n es un número entero 3 ó 4 y X significa un grupo -OLis-OH, -D-OLis-OH o -OGli-OH, así como sus sales por adición de ácido, amidas y ésteres ben- cílicos, caracterizado porque se separan los grupos pro- tectores desde péptidos que corresponden a la fórmula general antedicha - en donde, en la fórmula, n y X tie-
20 nen los significados anteriores - pero están protegidos por lo menos en el grupo amino terminal así como en los grupos amino de la cadena lateral y eventualmente también en el grupo carboxilo terminal y en los grupos carboxilo de la cadena lateral, y los compuestos obte-
25 nidos se transforman en caso deseado en sus sales por

14.12.75





adición de ácido, amidas o ésteres bencílicos.

5 2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque como sustancia de partida se utilizan péptidos cuyo grupo amino oxi N-terminal y los grupos amino están protegidos con grupos terc.-butiloxi carbonilo, y cuyos grupos carboxilo están protegidos con grupos éster terc.-butílico.

10 3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque se separan todos los grupos pro tectores mediante acidólisis.

4ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones 2ª ó 3ª, caracterizado porque se separan todos los grupos protectores con ácido trifluoroacético.

15 5ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª para la preparación de H-D-OSer-Tir-Ser-Met-Glu-His-
-Fe-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Lis-Lis-OGli-NH₂,
20 caracterizado porque como sustancia de partida se utiliza una amida de nonadecapéptido que está protegida en el grupo amino oxi-N-terminal, y en los grupos amino con grupos terc.-butiloxicarbonilo y en el grupo carboxilo con grupos éster terc.-butílico.

25 6ª.- Un procedimiento de preparación de nuevos péptidos.

14.12.75





Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, y para los fines que se han especificado.

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

5

Madrid, 16 DIC. 1975

P.A.

Alberto de Eizaburu
Por Poder 

10

15

20

25

14.12.75

EBL.

