

435990

22 A



P.- 59.950

Case F-2180 A

Int. Cl.: C07C/A61K

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION

A nombre de TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

entidad japonesa

establecida en 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka,  
Japón.

por: "UN METODO PARA PRODUCIR NUEVOS POLIPEPTIDOS".

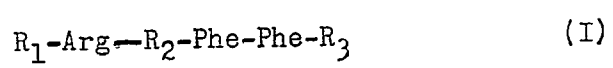
(Clase Internacional C07C)

4-4-75

- 1 -



La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos de la fórmula



5 donde  $R_1$  es hidrógeno, o un resto de aminoácido básico o neutro,  $R_2$  es un resto de aminoácido neutro, y  $R_3$  es  $NH_2$ , Tyr- $NH_2$  o un resto de péptidos de tirosilo que consta de 1 a 5 restos de aminoácido, o un residuo de amidas de péptidos de tirosilo, siempre que, cuando  $R_1$  sea hidrógeno,  $R_2$  sea Pro.

10 Los polipéptidos (I) se emplean de modo efectivo para el tratamiento de la insuficiencia del metabolismo de los carbohidratos y del metabolismo de los lípidos, especialmente para el tratamiento de la diabetes mellitus.

15 A lo largo de toda la Memoria descriptiva presente y de las reivindicaciones, se usan abreviaturas para denominar aminoácidos, péptidos y sus grupos activadores o protectores, y agentes activadores y protectores de aminoácidos o péptidos según los de la Comisión de la IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Biológica, o los usados comúnmente en este campo particular de la técnica. Son ejemplos de estas abreviaturas las siguientes:

25  $\alpha$ -Abu: ácido  $\alpha$ -aminobutírico



1975

$\gamma$ -Abu: ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
 $\xi$ -Acap: ácido  $\xi$ -aminocaproíco  
Ala: Alanina  
 $\beta$ -Ala:  $\beta$ -alanina  
5 Arg: Arginina  
 $\delta$ -Aval: ácido  $\delta$ -aminovalérico  
 $\alpha, \gamma$ -Dab: ácido  $\alpha, \gamma$ -diaminobutírico  
Gly: Glicina  
His: Histidina  
10 Leu: Leucina  
Lys: Lisina  
Nle: Norleucina  
Phe: Fenilalanina  
Pro: Prolina  
15 Sar: Sarcosina  
Ser: Serina  
Thr: Treonina  
Tyr: Tirosina  
Val: Valina  
20 Aoc: terc-amiloxicarbonilo  
Bzl: Eter bencílico  
DCC: N,N'-diciclohexilcarbodiimida  
HONB: N-hidroxi-5-norbornen-2,3-dicarboximida  
OBzl: Ester bencílico  
25 ODNP: Ester 2,4-dinitrofenílico





tados por  $R_1$  tienen, preferiblemente, de 2 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos de aminoácidos básicos son los  $\alpha$ -aminoácidos tales como el ácido  $\alpha, \beta$ -diaminopropiónico, ácido  $\alpha, \gamma$ -diaminobutírico, arginina, lisina o histidina. Los aminoácidos neutros representados por  $R_1$  son, por ejemplo, los  $\alpha$ -aminoácidos tales como la glicina, alanina, serina, treonina, ácido  $\alpha$ -aminobutírico, prolina, leucina, isoleucina, norleucina, fenilalanina y tirosina, y otros aminoácidos tales como la  $\beta$ -alanina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, ácido  $\delta$ -aminovalérico y ácido  $\epsilon$ -aminocaproico. Si hay isómeros ópticos con los aminoácidos representados por  $R_1$ , los aminoácidos pueden ser cualquiera de los isómeros ópticos y los compuestos racémicos. Entre los aminoácidos que corresponden a  $R_1$ , la  $\beta$ -alanina es preferiblemente para el uso que se pretende.

Los aminoácidos neutros representados por  $R_2$  tienen preferiblemente de 2 a 10 átomos de carbono, y son ejemplos de ellos la glicina, alanina,  $\beta$ -alanina, sarcosina, serina, prolina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y tirosina.

Entre los aminoácidos que corresponden a  $R_2$ , la glicina y la prolina son preferibles para el uso pretendido. En el caso en que  $R_2$  es un resto de prolina, el uso pretendido se consigue aun cuando  $R_1$  sea hidrógeno.



Los aminoácidos que pueden constituir los péptidos de tirosilo o sus amidas tienen preferiblemente de 2 a 10 átomos de carbono, y son ejemplos de los mismos la glicina, alanina, serina, treonina, valina, prolina, leucina, isoleucina, lisina, fenilalanina y tirosina. Esos aminoácidos están conjugados en cualquier secuencia para formar los péptidos de tirosilo o sus amidas que comprenden de 1 a 5 restos de aminoácido. A continuación se dan los ejemplos de estos péptidos de tirosilo, y sus amidas respectivas pueden ilustrarse de modo similar como amidas de péptidos de tirosilo:

- 1) Tyr-Gly-OH
- 2) Tyr-Ala-Gly-OH
- 3) Tyr-Leu-Ala-Gly-OH
- 4) Tyr-Leu-Gly-Val-Ala-OH
- 5) Tyr-Thr-Pro-Ser-Phe-OH
- 6) Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala-OH
- 7) Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-OH
- 8) Tyr-Ser-Pro-Arg-Gly-OH
- 9) Tyr-Pro-Ile-OH
- 10) Tyr-Leu-Leu-Leu-OH
- 11) Tyr-Gly-Gly-Gly-Gly-OH
- 12) Tyr-Ala-Ala-Ala-Ala-OH
- 13) Tyr-Thr-Pro-Lys-OH

Entre los aminoácidos y los péptidos de



tirosilo y sus amidas, el Tyr-NH<sub>2</sub> es preferible para el uso que se desea, así como para su producción industrial.

5 En cuanto a los aminoácidos representados por R<sub>2</sub> o que constituyen el grupo R<sub>3</sub>, en el caso en que haya isómeros ópticos los aminoácidos pueden ser cualquiera de los isómeros ópticos y compuestos racémicos. En cuanto a los restos de aminoácidos que constituyen los polipéptidos (I), excepto los representados por R<sub>1</sub>, y en el caso en que haya isómeros ópticos, son preferibles los restos de L-aminoácido por su menor toxicidad.

10 Según el procedimiento de la presente invención, los polipéptidos (I) se producen condensando un aminoácido que corresponde a R<sub>1</sub> o arginina, donde R<sub>1</sub> es hidrógeno, o un fragmento de péptido del polipéptido (I) que tiene el resto R<sub>1</sub> de aminoácido, o el grupo arginilo cuando R<sub>1</sub> es hidrógeno, en su aminoácido N-terminal, con el fragmento restante del polipéptido (I), y cada uno de los materiales de partida puede protegerse en su grupo amino o carboxilo que no tiene que tomar parte en la condensación considerada, y puede activarse en su grupo amino o carboxilo que toma parte en la condensación considerada, y eliminando los grupos protectores, si los hay, del producto resultante.

20 La condensación de la presente invención se efectúa según la condensación convencional per se



para la formación de enlaces peptídicos.

La condensación de la presente invención se efectúa entre cualquier posición que se desee de los polipéptidos (I) para formar los enlaces peptídicos o amídicos considerados. La condensación entre el 3er. componente de aminoácido correspondiente a  $R_2$  y el 4º componente de aminoácido correspondiente a la fenilalanina puede ser preferible para la producción industrial de los polipéptidos (I).

5

10

15

20

Igual que los compuestos polipeptídicos conocidos, los polipéptidos de esta invención pueden sintetizarse a partir de materiales aminoácidos que son componentes del polipéptido producto, por medio de la repetición de reacciones de condensación. Y, usualmente, la última operación de la síntesis es la condensación entre dos componentes, es decir un péptido y un aminoácido terminal, o dos péptidos. Estos dos componentes son los materiales de partida de la última operación de las condensaciones para sintetizar el producto. Estos materiales de partida o compuestos intermedios pueden obtenerse por medio de cualquiera de los procedimientos comunes per se empleados para la síntesis de péptidos.

25

Los materiales de partida del procedimiento de la presente invención se ilustran por los aminoácidos per se de aminoácidos N-terminales de los polipéptidos



(I), y por fragmentos de péptidos que constan de los aminoácidos N-terminales a los que se une consecutivamente cada uno de los aminoácidos según la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos (I). Los materiales de partida de acoplamiento son fragmentos del resto de los polipéptidos (I), excepto los materiales de partida citados.

En la tabla que sigue se dan los ejemplos principales de combinaciones de los materiales de partida y sus materiales de partida de acoplamiento.

Tabla 1

Materiales de partida	
R <sub>1</sub> -OH	H-Arg-R <sub>2</sub> -Phe-Phe-R <sub>3</sub>
R <sub>1</sub> -Arg-OH	H-R <sub>2</sub> -Phe-Phe-R <sub>3</sub>
R <sub>1</sub> -Arg-R <sub>2</sub> -OH	H-Phe-Phe-R <sub>2</sub>
R <sub>1</sub> -Arg-R <sub>2</sub> -Phe-OH	H-Phe-R <sub>3</sub>
R <sub>1</sub> -Arg-R <sub>2</sub> -Phe-Phe-OH	H-R <sub>3</sub>
R <sub>1</sub> -Arg-R <sub>2</sub> -Phe-Phe-OH	H-Tyr-NH <sub>2</sub>
R <sub>1</sub> -Arg-R <sub>2</sub> -Phe-Phe-Tyr-OH	NH <sub>3</sub>



La reacción de condensación según esta invención puede efectuarse por medios de condensación conocidos para la formación de enlaces peptídicos. Entre estos medios de condensación están el procedimiento DCC/HONB (patente Belga nº 796.399), el procedimiento de la azida, el procedimiento del cloruro, el procedimiento del anhídrido de ácido, el procedimiento del anhídrido de ácido mixto, el procedimiento DCC, el procedimiento del éster activo, el procedimiento del reactivo K de Woodward, el procedimiento del carbodiimidazol, el procedimiento de oxidación-reducción, y otros (The Peptides, Vol. 1 (1966), Schröder y Lubke, Academic Press, Nueva York, EE.UU.).

Antes de la reacción de condensación, se pueden proteger los grupos carboxilo y amino que no han de tomar parte en la reacción considerada, o activar los grupos carboxilo y/o amino que han de tomar parte en la reacción considerada, por medios conocidos per se. Los grupos carboxilo del material de partida que no han de tomar parte en la reacción considerada pueden protegerse en forma de sales metálicas (por ej. sales de sodio y de potasio) o ésteres (por ej. ésteres de metilo, etilo, bencilo, p-nitrobencilo, terc-butilo o terc-amilo).

Los grupos protectores de los grupos amino de los materiales de partida pueden ser cualquiera de los grupos protectores convencionales para grupos amino co-



5 nocidos en la síntesis de péptidos, por ej. benciloxi  
carbonilo, terc-butoxicarbonilo, terc-amiloxicarbonilo,  
isoborniloxicarbonilo, etc. Estos grupos protectores  
pueden emplearse para proteger el grupo imino de la pro  
lina. La función imidazol de la histidina puede prote-  
gerse con cualquier grupo protector convencional, tal  
como el bencilo, tosilo, 2,4-dinitrofenol, terc-butoxicar  
bonilo o carbобензоxi. El grupo hidroxilo de la serina,  
la tirosina o la treonina puede protegerse con un grupo  
10 protector convencional, tal como el bencilo, terc-butí  
lo y otros grupos formadores de éteres. El grupo gua  
nidino de la arginina puede protegerse con grupos tales  
como el nitro, tosilo, carbобензоxi, isoborniloxicarbo  
nilo o adamantiloxicarbonilo. Como ejemplos de grupos  
15 carboxilo activados en los materiales de partida, pueden  
citarse los correspondientes anhídrido de ácido, azida,  
ésteres activos (ésteres con alcoholes, por ej. penta  
clorofenilo, 2,4,5-triclorofenol, 2,4-dinitrofenol, al  
cohol cianometílico, p-nitrofenol, N-hidroxi-5-norbornen-  
20 -2,3-dicarboximida, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxi-ftali  
mida o N-hidroxi-benzotriazol) etc. Los grupos amino ac-  
tivados de los materiales de partida pueden ser, por  
ejemplo, las correspondientes amidas con ácido fosfó  
rico.

25

En la tabla siguiente se muestran algunos

4-4-75



ejemplos de combinaciones de estas formas de grupos carbo  
xilo y amino en los materiales (A) y (B).

Tabla 2

5 Ejemplos de com- binacio- nes	Materiales de partida			
	(A)		(B)	
	COOH	NH <sub>2</sub>	COOH	NH <sub>2</sub>
10 1*	Libre	Protegido	Protegido	Libre
2	Activado	Protegido	Libre	Libre
15 3	Libre	Protegido	Protegido	Activado

Nota. En el caso señalado con un asterisco \*, preferible-  
mente hay presente un agente deshidratante (por ej.  
un reactivo de carbodiimida tal como dicitclohexil-  
carbodiimida) en el sistema de reacción.

La condensación de la presente invención puede  
efectuarse en presencia de un disolvente. El disolvente  
puede seleccionarse de entre los conocidos como útiles para  
las reacciones de condensación de péptidos. Así, puede ci-  
tarse como ejemplo la dimetilformamida, el dimetilsulfóxido,



la piridina, el cloroformo, dioxano, diclorometano, tetrahidrofurano, anhidros o acuosos, y las mezclas adecuadas de tales disolventes.

5           La temperatura de reacción se selecciona de entre el intervalo conocido como utilizable para las reacciones que conducen a la formación de enlaces peptídicos, es decir normalmente en el intervalo de aproximadamente -20°C a aproximadamente 30°C. Además, los materiales  
10           precursores (péptidos protegidos) de los compuestos considerados según esta invención pueden prepararse también fácilmente por procedimientos sintéticos en fase sólida.

          Una vez que se ha completado la reacción de condensación considerada, y si el producto lleva grupos protectores, pueden eliminarse éstos por procedimientos  
15           rutinarios. Entre estos procedimientos rutinarios se encuentran la reducción catalítica en presencia de un catalizador tal como negro de paladio, paladio sobre carbón, platino, o similar, solvolisis por medio de fluoruro de hidrógeno, ácido trifluoroacético o similar, y reducción  
20           con sodio metálico en amoníaco líquido.

          El péptido (I) así producido puede recuperarse a partir de la mezcla de productos de reacción por procedimientos conocidos para la recuperación de péptidos, por  
25           ej. por extracción, distribución, cromatografía en columna, etc.

22 ABR. 1975

La reacción de la presente invención puede efectuarse por un método en fase sólida conocido per se.

El polipéptido (I) puede recuperarse también en forma de una sal o de compuesto de complejo metálico.

5 Como ácidos que son capaces de formar sales con el polipéptido (I) pueden citarse los ácidos inorgánicos tales como el ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociánico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, etc., y los ácidos orgánicos  
10 tales como el ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido cinámico, ácido naftalensulfónico o ácido  
15 sulfanílico, por ejemplo.

Los metales que son capaces de formar compuestos complejos con el polipéptido (I) incluyen, entre otros, el zinc, níquel, cobalto, cobre y hierro. Tal compuesto complejo metálico puede producirse por procedimientos convencionales, por ejemplo haciendo reaccionar el polipéptido (I) con el hidróxido u óxido de un metal del tipo antes citado a un pH de aproximadamente 6 a 8.

25 Los polipéptidos (I) de la presente invención causan el efecto de disminuir los altos contenidos

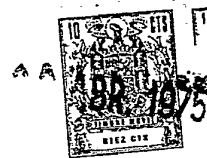


de glucosa en la sangre y en la orina hasta un nivel normal, no sólo por administración parenteral, sino también por administración oral. Los polipéptidos (I) tienen una actividad sorprendentemente efectiva de no reducir un nivel normal de glucosa en la sangre y la orina, en lo que son muy superiores a la insulina, que causa hipoglucemia. Los polipéptidos (I) son de baja toxicidad y su administración es segura. Los polipéptidos (I) tienen también actividad de estimulación del metabolismo de los lípidos. Teniendo tal utilidad específica, los polipéptidos (I) se administran de modo eficaz a los seres humanos y otros animales, tales como las ratas o ratones, por vía oral o parenteral, para tratar la insuficiencia del metabolismo de los carbohidratos y del metabolismo de los lípidos, especialmente para tratar la diabetes o la hipercolesteremia, sin causar ningún efecto indeseable. Los polipéptidos (I) pueden administrarse como tales o en cualquier forma farmacéutica, tal como comprimidos, pastillas, gránulos, polvo, líquido o inyección, que pueden prepararse por procedimientos conocidos per se.

Las siguientes son ejemplos de composiciones farmacéuticas.

Inyección

Polipéptido (I) de fórmula diacetato de



$\beta$ -Ala-L-Arg-L-Pro-L-Phe-L-Phe-L-Tyr-NH<sub>2</sub> 50 mg  
Disolución salina fisiológica 2,0 ml.

Polvo

Polipéptido (I) de fórmula · dicitrato de  
5  $\beta$ -Ala-L-Arg-Gly-L-Phe-L-Phe-L-Tyr-NH<sub>2</sub> 30 mg  
Almidón 200 mg.

Aunque la dosis diaria de los polipéptidos (I) es variable según la enfermedad, la gravedad de la misma, edad del paciente, etc., usualmente está seleccionada entre aproximadamente 50 microgramos y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal.

Experimento farmacológico de mejora de la diabetes por medio de los polipéptidos (I).

Unas hembras de ocho semanas de edad de ratones genéticamente diabéticos (ratones KKA<sup>Y</sup> o KK amarillos) se mantuvieron individualmente en jaulas metálicas para recoger la orina. A tres grupos de ratones se les administró por vía oral el polipéptido (I) de fórmula beta-Ala-L-Arg-Gly-L-Phe-L-Phe-L-Tyr-NH<sub>2</sub> (Compuesto A) a tres dosificaciones diferentes (1, 10 y 100 mg/kg/día). El procedimiento de tratamiento se detalla en la Tabla 3. Al grupo testigo se le administró disolución salina. Cada 4 días se determinó la glucosa en el plasma y en la orina por el método de la glucosa oxidasa (Hugget, A. St. G. y Nixon, D.A., "Lancet", volumen II, págs. 368-370, 1957).

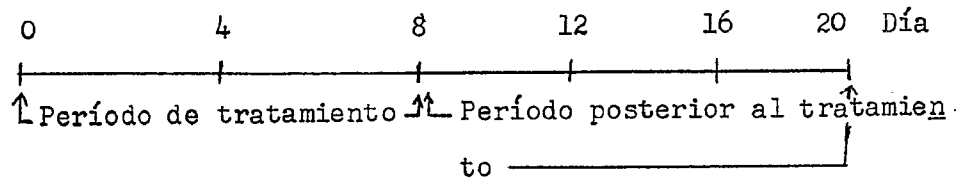


Los resultados se indican en la Tabla 3.

En el grupo testigo, el nivel de glucosa en el plasma y la glucosa segregada en la orina durante 24 horas fueron muy elevados durante todo el período del experimento. Por el contrario, tanto la glucosa del plasma como la glucosa en la orina de los grupos tratados con el polipéptido disminuyeron gradualmente durante el tratamiento. En estos efectos antidiabéticos pudo observarse una dependencia de la dosis. En la fase de después del tratamiento, ambos niveles de glucosa se elevaron en los tres grupos tratados. Sin embargo, se observó una dependencia de la dosis en la persistencia de los efectos antidiabéticos después de suprimir el tratamiento.

De estos descubrimientos puede deducirse que el polipéptido mejora la diabetes de estos ratones.

Procedimiento de tratamiento:



PG: glucosa en el plasma (mg/100 ml). UG: glucosa en la orina (g/día)

\* significativo para el grupo de disolución salina ( $p < 0,05$ )

\*\* significativo para el grupo de disolución salina ( $p < 0,01$ )

25

4-4-75

Tabla 3

Medicamento	Número de ratones	Pre-tratamiento		Día de tratamiento con medicamento						Pos tratamiento (día)					
				4º		8º		12º		16º		20º			
		PG	UG	PG	UG	PG	UG	PG	UG	PG	UG	PG	UG		
Disolución salina	5	445±39	0,560± 0,072	483± 35	0,484± 0,051	528± 45	0,635± 0,072	497± 76	0,557± 0,152	447± 22	0,462± 0,070	513± 53	0,486± 0,052		
Compuesto A mg/kg/día	5	457±43	0,595± 0,081	352± 36	0,299± 0,092	343± 17**	0,213± 0,079**	370± 40	0,190± 0,010	469± 22	0,451± 0,091	523± 58	0,450± 0,056		
Compuesto A 10 mg/kg/día	3	458±43	0,571± 0,075	433± 78	0,160± 0,061**	338± 35*	0,0786± 0,0346**	354± 25	0,0858± 0,0472	396± 7	0,238± 0,099	513± 101	0,478± 0,022		
Compuesto A 100 mg/kg/día	5	455±14	0,582± 0,068	344± 27*	0,0743± 0,0279**	254± 41**	0,0446± 0,0200**	232± 19**	0,0466± 0,022*	339± 44	0,0750± 0,0188**	457± 51	0,250± 0,045**		

22 ABR 1964





En todos los Ejemplos prácticos, en caso en que haya isómeros ópticos con respecto a aminoácidos, los aminoácidos están en forma de la configuración L-, a no ser que se indique específicamente otra cosa.

5

Ejemplo 1

Producción de Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

10 En 50 ml de DMF (dimetilformamida) se disolvieron 10,0 g de Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> y se efectuó una reducción catalítica con negro de Pd como catalizador durante 10 horas. El catalizador se separó por filtración, y, mientras el producto de filtración se enfriaba con hielo, se añadieron 7,37 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OH y 3,53 g de HONB.

15

Este procedimiento se siguió después por adición de 4,06 g de DCC, y la mezcla se agitó durante 16 horas. La DC-urea (diciclohexil-urea) formada se separó por filtración, y la DMF se separó por destilación bajo presión reducida. Al residuo se le añadieron 200 ml de acetato de etilo y el polvo resultante se recogió por filtración. El polvo se purificó por reprecipitación a partir de DMF-metanol-agua. Rendimiento 20 14,5 g (95,6%); punto de fusión: 100-103°C  $[\alpha]_D^{24} -29,7^{\circ}$  (c=0,55%, DMF).

4-4-75

22 ABR 1975

Análisis elemental, para  $C_{46}H_{54}O_{10}N_{10} \cdot H_2O$

Calculado: C 59,73; H 6,10; N 15,11

Encontrado: C 59,51; H 6,06; N 14,90

b) Preparación de Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

5 En 30 ml de ácido acético se disolvieron 500 mg de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica con negro de Pd como catalizador, durante 20 horas. El catalizador se separó por filtración, y el producto de filtración se concentró hasta 10 sequedad bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 50 ml de agua, y, después de separar por filtración las pequeñas cantidades de materiales insolubles, el producto de filtración se liofilizó. El producto se di 15 solvió en 5 ml de agua y la disolución se aplicó sobre una columna (1,8 x 9 cm) de carboximetil-sephadex. Se efectuó una elución por gradiente con acetato de amonio acuoso 0,1 M (400 ml) y acetato de amonio acuoso 1 M (400 ml). Las fracciones de 250 ml a 370 ml se reunieron y se liofilizaron para dar 250 mg (52,3%) de un producto espon- 20 joso blanco.  $[\alpha]_D^{24} -41,9^\circ$  (c= 0,47%, agua).

Análisis de aminoácidos (hidrólisis con HCl): Arg. 1,00;

Pro. 1,05; Tyr, 0,91;

Phe. 1,96. (contenido de péptido, 86,5%)

25 Análisis elemental, para  $C_{38}H_{49}O_6N_9 \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 2H_2O$

4-4-75



Calculado: C 57,06; H 6,96; N 14,26  
 Encontrado : C 56,76; H 6,98; N 14,28

Ejemplo 2

5 Producción de Gly-Arg--Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de Z-Gly-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 30 ml. de ácido acético se disolvieron 800 mg de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó la reducción catalítica con negro de Pd como catalizador, durante 8 horas. El catalizador se separó por filtración, y el producto de la filtración se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 20 ml de agua y se liofilizó.

El polvo resultante se disolvió en 10 ml de DMF, y se añadieron 147 mg de monohidrato de ácido p-toluensulfónico. A la mezcla se le añadieron 349 mg de Z-Gly-ONB. y después se agitó durante 10 horas. La DMF se separó por destilación bajo presión reducida y se añadieron 50 ml de acetato de etilo. El polvo resultante se recogió por filtración. Rendimiento 858 mg (89,5%); punto de fusión: 119-121°C.  $[\alpha]_D^{23} -26,7^\circ$  (c = 0,96%, DMF)

Análisis elemental, para C<sub>48</sub>H<sub>58</sub>O<sub>9</sub>N<sub>10</sub>.C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>.S.H<sub>2</sub>O

Calc.: C 59,55; H 6,18; N 12,63; S 2,89

25 Encont.: C 59,45; H 6,08; N 12,37; S 2,76

22 APR 1976

b) Preparación de Gly-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 30 ml. de ácido acético se disolvieron 500 mg de p-toluensulfonato de Z-Gly-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó la reducción catalítica con negro de Pd como catalizador, durante 5 horas. El catalizador se separó por filtración y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 20 ml de agua y la disolución se sometió a cromatografía de cambio de iones en una columna de Amberlite IRA 410 (forma de acetato). (Resina de cambio aniónica fuertemente básica de la Rohm & Haas Co. Ltd. EE.UU). El producto de elución se liofilizó y el polvo resultante se disolvió en 5 ml de agua. La disolución se aplicó sobre una columna (2,6 x 23 cm) de carboximetilcelulosa, y se efectuó la elución por el método del gradiente, usando acetato de amonio acuoso de 0,005 M a 0,2 M (700 ml cada vez). Las fracciones desde 840 ml a 970 ml se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento 270 mg (63,6%).

$[\alpha]_D^{22} = -62,0^\circ$  (c = 0,46%, agua).

20 Análisis elemental, para C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>7</sub>N<sub>10</sub> · 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O

Calca : C 56,15; H 6,86; N 14,89

Encontr.C 55,99; H 6,92; N 14,77

Análisis de aminoácidos: Arg. 0,94; Pro. 1,06; Gly. 1,00;

Tyr. 0,94; Phe. 2,03 (contenido

de péptido: 83,2%)

25

22.38.197

Ejemplo 3

Producción de  $\gamma$ -Abu-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

Se siguió el procedimiento del Ejemplo 2, excepto en que se usó Z  $\gamma$ -Abu-ONB en lugar de Z-Gly-ONB, obteniéndose 324 mg del compuesto arriba indicado.  $[\alpha]_D^{22} = -58,7^{\circ}$  (c = 0,45%, agua).

Análisis elemental, para C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>O<sub>7</sub>N<sub>10</sub>·2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O

Calc.: C 55,97, H 7,15; N 14,19

Encont.: C 56,14; H 7,36; N 13,92

10 Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00; Pro. 1,08; Tyr. 0,97; Ph. 2,13 (contenido de péptido: 80,8%)

Ejemplo 4

Producción de  $\xi$ -Acap-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

15 a) Preparación de Z- $\xi$ -Acap-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

En 10 ml de DMF se disolvieron 250 mg de Z-epsilon-Acap-OH, y, bajo enfriamiento con hielo, se añadieron 186 mg de HONB y 214 mg de DCC. La mezcla se agitó durante 16 horas, y la DC-urea formada se separó por filtración. El producto de filtración se añadió a una disolución de p-toluensulfonato de H-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, que se había preparado del mismo modo que en el Ejemplo 2-a). La mezcla se agitó durante 12 horas, y la DMF se separó por destilación bajo presión reducida. Al residuo se le añadieron 30 ml de acetato de etilo, y

22 ABR. 1975

el polvo resultante se recogió por filtración. Rendimiento 810 mg (79,1%); punto de fusión: 90-92°C.  $[\alpha]_D^{23}$  -30,3° (c = 1,07%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{52}H_{66}O_9N_{10} \cdot C_7H_8O_3S \cdot 2H_2O$

5 Calc.: C 59,88; H 6,65; N 11,84; S 2,80

Encont.: C 59,81; H 6,75; N 11,80; S 3,00

b) Preparación de epsilon-Acap-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

500 mg del derivado de Z preparado en a) se trataron de la misma manera que en el Ejemplo 2-b), para obtener 316 mg del compuesto antes indicado.  $[\alpha]_D^{23}$  -58,9° (c = 0,55%, agua).

15 Análisis de aminoácidos: Arg. 1,02; Pro. 1,03; Tyr. 0,92; Phe. 2,13; epsilon Acap (no se determinó) (contenido de péptido: 81,5%)

#### Ejemplo 5

Producción de Lys-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de di-Z-Lys-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

20 Se repitió el procedimiento del Ejemplo 4-a), excepto en que se usaron 390 mg de di-Z-Lys-OH en lugar de Z-ε-Acap-OH, para obtener 932 mg del compuesto antes indicado. Punto de fusión: 103-105°C.  $[\alpha]_D^{23}$  -28,5° (c = 1,04%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{60}H_{73}O_{11}N_{11} \cdot C_7H_8O_3S \cdot 2H_2O$

25 Calc.: C 60,39; H 6,43; N 11,56, S 2,41



Encont.: C 60,64; H 6,21; N 11,79; S 2,82

b) Preparación de Lys-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

500 mg del derivado di-Z preparado en a) se trataron de la misma manera que en el Ejemplo 2-b) para obtener 336 mg del compuesto antes indicado.  $[\alpha]_D^{23}$  -52,6° (c = 0,57%, agua).

Análisis de aminoácidos: Lys. 1,02; Arg. 0,98; Pro. 1,00; Tyr. 0,94; Phe 2,04 (contenido de péptido: 91%)

10 Ejemplo 6

Producción de  $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

Exactamente del mismo modo que en los Ejemplos 4 y 5, el compuesto antes indicado se sintetizó a partir de 535 mg de la sal de di-Z- $\alpha, \gamma$ -Dab-diciclohexilamina. Rendimiento 325 mg.  $[\alpha]_D^{23}$  -58,2° (c = 0,50%, agua)

15 Análisis de aminoácidos:  $\alpha, \gamma$ -Dab. 1,00; Arg. 0,98; Pro. 1,00; Tyr. 0,87; Phe. 1,96 (contenido de péptido: 84,2%)

Ejemplo 7

20 Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OMe.

A 3,50 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OMe se le añadieron 35 ml de HBr-ácido acético al 25%, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 35 minutos. A esta mezcla se le añadieron 300 ml de éter etílico, y el precipitado

22 ABR. 1975

resultante se recogió por filtración, se lavó con éter y se secó.

5 El polvo se disolvió en 25 ml de DMF, y, con enfriamiento con hielo, la disolución se neutralizó con trietilamina. Después de la adición de 2,9 g de Z-beta-Ala-ONB, la mezcla se agitó durante 16 horas.

10 La DMF se separó por destilación bajo presión reducida, y el residuo se disolvió en 300 ml de acetato de etilo. La disolución se lavó tres veces con porciones de 100 ml de bicarbonato de sodio acuoso al 4%. Después de lavar con agua, la disolución se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadió acetato de etilo al residuo. El polvo resultante se recogió por filtración. Rendimiento 3,05 g (74,3%); punto de fusión: 62-65°C;  $[\alpha]_D^{22} -34,1^\circ$  (c = 1,04%, DMF).

15 Análisis elemental, para  $C_{23}H_{33}O_8N_7 \cdot 1/2H_2O$

Calc.: C 50,73; H 6,29; N 18,01

Encontr.: C 50,98; H 6,36; N 17,72

20 b) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OH

En 30 ml de acetona se disolvieron 2,82 g de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OMe, y, con enfriamiento con hielo, se añadieron 10,7 ml de hidróxido de sodio acuoso 1N. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de neutralizar la mezcla con 11 ml

22 ABR 1957

de ácido clorhídrico 1N, la acetona se separó por desti-  
lación bajo presión reducida. Al residuo aceitoso se  
le añadieron 30 ml de agua fría, y el agua se separó  
por decantación. El residuo se lavó una vez con agua  
5 fría y se secó. Después se cromatografió sobre una colum-  
na de gel de sílice (90 g) con un disolvente revelador,  
acetato de etilo-piridina-ácido acético-agua (60:20:6:11).  
Las fracciones ricas en el compuesto buscado se reunieron  
y se concentraron hasta sequedad bajo presión reducida.  
10 El residuo se lavó con éter y se recogió por filtración.  
Rendimiento 2,62 g; punto de fusión: 65-67°C;  $[\alpha]_D^{22}$   
-27,5° (c = 1,07%, DMF).  
Análisis elemental, para  $C_{22}H_{31}O_8N_7$  : Calc.: C 50,66; H 5,99;  
N 18,80  
15 Encontr.: C 50,41; H 6,19;  
N 18,58

c) Preparación de  $Z-\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.  
En 15 ml de DMF se disolvieron 1,50 g de  
Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica  
20 con negro de Pd como catalizador, durante 4 horas. El ca-  
talizador se separó por filtración, y, mientras el produc-  
to de filtración se enfriaba con hielo, se añadieron 1,21  
g de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OH, 0,53 g de HONB y 0,61 g de  
DCC. La mezcla se agitó durante 18 horas. La DC-urea for-  
25 mada se separó por filtración, y la DMF se evaporó por des



5 tilación bajo presión reducida. Al residuo se le añadieron 50 ml de agua, y el polvo resultante se recogió por filtración y se secó. El polvo se precipitó de nuevo a partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 1,99 g (80,9%); punto de fusión: 135-138°C;  $[\alpha]_D^{22}$  -33,1° (c = 0,9%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{49}H_{59}O_{11}N_{11} \cdot H_2O$  :

Calc.: C 59,08; H 6,17; N 15,47

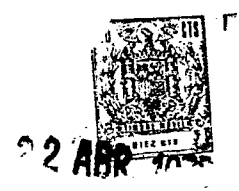
Encontr.: C 58,93; H 6,18; N 15,02.

10 d) Preparación de  $\beta$ -Ala-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

15 En 40 ml de ácido acético glacial se disolvieron 1,50 g de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica, con negro de Pd como catalizador, durante 8 horas. El catalizador se eliminó por filtración, y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida.

20 El residuo se disolvió en 50 ml de agua, y las pequeñas cantidades de materiales insolubles se separaron por filtración. El producto de filtración se liofilizó. El producto se disolvió además en 20 ml de agua, y se hizo pasar a través de una columna (3,0 x 28 cm) de carboximetilcelulosa, que se eluyó por el método del gradiente con acetato de amonio acuoso 0,005M y 0,2M (1,5 l cada vez). Las fracciones desde 1490 ml hasta 1840 ml se reunieron y se liofilizaron. Rendimien

25



to 980 mg (65,7%);  $[\alpha]_D^{22} -59,1^\circ$  (c = 0,52%, agua).

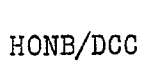
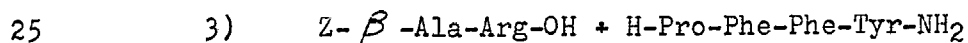
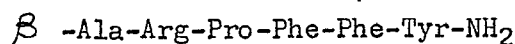
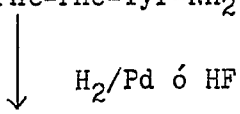
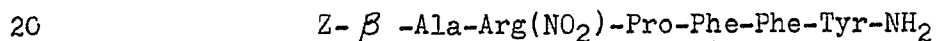
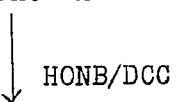
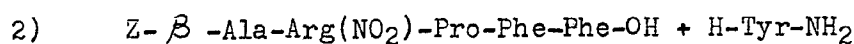
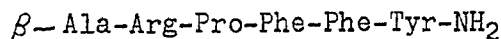
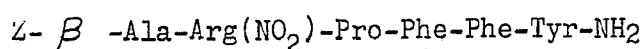
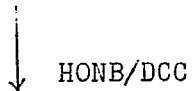
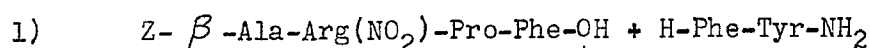
Análisis elemental, para  $C_{41}H_{54}O_7N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 4H_2O$

Calc.: C 54,53; H 7,12; N 14,13

Encontr. C 54,34; H 6,98; N 13,98

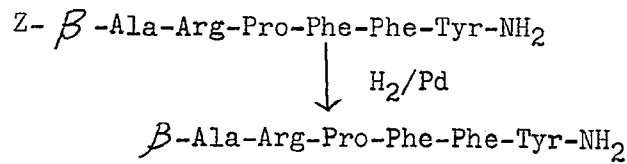
5 Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00; Pro. 1,11; Tyr. 1,00;  
Phe. 2,11; beta-Ala. 0,94 (con-  
tenido de péptido: 75,7%)

De la misma manera que en c) y d) anterior-  
mente, puede producirse el mismo compuesto buscado según  
10 las siguientes fórmulas de reacción:





2 ABR. 1975



Ejemplo 8

5

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.

En el procedimiento del Ejemplo 7-c), se sustituye Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> por Z-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y se siguen los mismos procedimientos que los explicados en el Ejemplo 7-c), obteniéndose 1,24 g del compuesto antes indicado, en forma de un producto esponjoso blanco.

10

$[\alpha]_D^{22} -48,6^\circ$  (c = 0,42%, agua)

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,08; Pro. 1,00; Phe. 1,98; beta-Ala. 0,97 (contenido de péptido: 82,6%).

15

Ejemplo 9

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-beta-Ala-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

20

En 40 ml de DMF se disolvieron 2,00 g de Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica con negro de Pd como catalizador durante 5 horas. El catalizador se separó por filtración, y se añadieron al producto de filtración 1,39 g de Z- $\beta$ -Ala-ONB. La mezcla se agitó durante 9 horas, y la DMF se separó por filtración bajo presión reducida. Al residuo se le añadieron

25



50 ml de agua, y el polvo resultante se recogió por filtración y se secó. El producto se precipitó de nuevo a partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 2,02 g (88,0%); punto de fusión:  $232^{\circ}\text{C}$   $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -23,4^{\circ}$   
 5 (c = 0,94%, DMF).

Análisis elemental, para  $\text{C}_{38}\text{H}_{41}\text{O}_7\text{N}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Calc.: C 65,41; H 6,21; N 10,04

Encontr.: C 65,18; H 6,20; N 10,32

b) Preparación de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-β-Ala-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

10 En 30 ml de DMF se disolvió 1,0 g de Z-β-Ala-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 6 horas, usando negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración. Al producto de filtración se le añadió una disolución de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-  
 15 -ODNP en tetrahidrofurano (el éster de dinitrofenilo preparado a partir de 0,52 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH y 0,30 g de 2,4-dinitrofenol en 10 ml de tetrahidrofurano, por el procedimiento DCC). La mezcla se agitó durante 13 horas, y el disolvente se separó por destilación. Al residuo  
 20 se le añadieron 50 ml de agua, y el polvo resultante se recogió por filtración y se secó. Rendimiento 1,01 g (74,9%); punto de fusión:  $192-194^{\circ}\text{C}$   $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -11,1^{\circ}$   
 (c = 1,02%, DMF).

Análisis elemental, para  $\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{O}_{10}\text{N}_{10} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

25 Calc.: C 57,63; H 6,16; N 15,28



Encontr.: C 57,63; H 5,93; N 15,61.

c) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)- $\beta$ -Ala-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

5 A 700 mg. de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)- $\beta$ -Ala-Phe-Phe-  
 -Tyr-NH<sub>2</sub> se le añadieron 0,2 ml de anisol, seguidos de  
 7 ml de HBr-ácido acético al 25%. La mezcla se agitó  
 a temperatura ambiente durante 40 minutos. A la mezcla  
 de reacción se le añadieron 100 ml de éter etílico, y  
 el precipitado resultante se recogió por filtración y  
 10 se lavó con éter etílico. Después de secarlo bien, el  
 precipitado se disolvió en 10 ml de DMF, y, bajo enfria-  
 miento con hielo, la disolución se neutralizó con trietil  
 amina. Después de la adición de 336 mg de Z- $\beta$ -Ala-ONB,  
 la disolución se agitó durante 18 horas. La DMF se se-  
 15 paró por destilación bajo presión reducida y se añadieron  
 50 ml de agua al residuo. El precipitado resultante se  
 seco y se precipitó de nuevo a partir de DMF y acetato  
 de etilo. Rendimiento 560 mg (73%); punto de fusión:  
 200-202°C (con descomp.);  $[\alpha]_D^{22}$  -7,3° (c = 0,91%, DMF).  
 20 Análisis elemental, para C H O N .H O: ..:

47 57 11 11 2

Calc.: C 58,19; H 6,13; N 15,89

Encont.: C 58,06; H 6,41; N 15,57.

d) Preparación de  $\beta$ -Ala-Arg- $\beta$ -Ala-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

25 En 30 ml de ácido acético glacial se disol-



375

vieron 400 mg de Z-  $\beta$ -Ala-(Arg(NO<sub>2</sub>))-  $\beta$ -Ala-Phe-Phe-  
 -Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica con  
 negro de Pd como catalizador, durante 8 horas. El ca-  
 talizador se eliminó por filtración y el disolvente se  
 separó por destilación bajo presión reducida. El resi-  
 5 duco se disolvió en 5 ml de agua, y la disolución se hizo  
 pasar a través de una columna (2,6 x 22 cm) de carboxi  
 metilcelulosa. Se efectuó una elución por gradiente  
 usando disoluciones acuosas 0,005M y 0,2M de acetato  
 10 de amonio (700 ml cada vez). Las fracciones de 720 ml  
 a 870 ml se reunieron y se liofilizaron para obtener  
 270 mg (69,1%) de un producto esponjoso blanco.

$[\alpha]_D^{22} -17,2^\circ$  (c = 0,53%, agua).

15 Análisis elemental, para C<sub>39</sub>H<sub>52</sub>O<sub>7</sub>N<sub>10</sub> · 2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O

Calc.: C 54,53; H 7,03; N 14,79.

Encont.: C 54,52; H 6,96; N 15,00

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00; Tyr. 1,00;  
 Phe 2,03;  $\beta$ -Ala. 2,14 (con-  
 tenido de péptido, 79,0%).

20 Ejemplo 10

Producción de Ala-Arg-  $\beta$ -Ala-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En el procedimiento del Ejemplo 9-c), se  
 sustituyó Z-beta-Ala-ONB por 340 mg de Z-Ala-ONB, y  
 se siguieron los mismos procedimientos que en el Ejem-  
 25 plo 9-c) a d), obteniéndose 297 mg del compuesto antes



indicado, en forma de un producto blanco esponjoso.

$[\alpha]_D^{24} -18,9^\circ$  (c = 0,62%, agua).

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,02; Ala. 1,04; Tyr. 0,97;  
Phe. 2,00;  $\beta$ -Ala. 0,97 (contenido de péptido, 81,0%).

5

### Ejemplo 11

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Sar-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

a) Preparación de Z-Sar-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

10

En 30 ml de dimetilformamida se disolvieron 2,02 g de Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica con negro de Pd como catalizador durante 5 horas. El catalizador se separó por filtración y el producto de filtración se enfrió. Por otro lado, 810

15

mg de Z-Sar-OH se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano, seguido por la adición de 0,71 g de HONB. La mezcla se enfrió a 0°C y se añadieron 0,82 g de DCC. La mezcla se agitó durante 3 horas. La DC-urea formada se separó por filtración, y el producto de filtración

20

se añadió a la anterior disolución en DMF. La mezcla se agitó durante 20 horas. El disolvente se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadieron al residuo 50 ml de agua. El polvo resultante se recogió por filtración y se precipitó de nuevo a partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento: 1,90 g (83,8%);

25



punto de fusión: 246-248°C (con descomp.);  $[\alpha]_D^{23}$   
-9,7° (c = 1,07%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{38}H_{41}O_7N_5 \cdot 1/2H_2O$

Calc.: C 66,26; H 6,15; N 10,17

5                    Encont.: C 66,32; H 6,39; N 10,52

b) Preparación de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Sar-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 10 ml de DMF se disolvieron 1,0 g de  
Z-Sar-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> y se efectuó una reducción cata-  
lítica con negro de Pd como catalizador, durante 7 horas.  
10 El catalizador se separó por filtración y el producto de  
filtración se enfrió. Por otro lado, 0,52 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-  
-OH se disolvieron en 10 ml de tetrahidrofurano, y, bajo  
enfriamiento con hielo, se añadieron 0,3 g de 2,4-dini-  
trofenol y 0,33 g de DCC. La mezcla se agitó durante  
15 3 horas. La DC-urea formada se separó por filtración, y  
el producto de filtración se añadió a la anterior diso-  
lución de DMF. La mezcla se agitó durante 20 horas, y  
el disolvente se separó por destilación bajo presión  
reducida. Al residuo se le añadieron 50 ml de agua y  
20 el polvo resultante se recogió por filtración. Una  
vez secado, el polvo se precipitó de nuevo a partir de  
DMF-acetato de etilo-éter etílico. Rendimiento 1,04 g  
(77,2%); punto de fusión: 96-98°C;  $[\alpha]_D^{23}$  -7,3° (c =  
1,06%, DMF).

25                    Análisis elemental, para  $C_{44}H_{52}O_{10}N_{10} \cdot 2H_2O$



Calc.: C 57,63; H 6,16; N 15,28

Encont.: C 57,60; H 6,10; N 15,01

c) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Sar-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

5 En 7 ml de HBr-ácido acético al 25% se disolvieron 700 mg de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Sar-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> y 0,2 ml de anisol, y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. A esta mezcla de reacción se le añadieron 100 ml de éter etílico y el precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con éter y se secó sobre lentejas de hidróxido de sodio durante 2 horas.

15 El precipitado secó se disolvió en 10 ml de DMF, y, con enfriamiento con hielo, la disolución se neutralizó con trietilamina. Después de la adición de 336 mg de Z- $\beta$ -Ala-ONB, la disolución se agitó durante 20 horas. La DMF se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadieron 50 ml de agua. El polvo resultante se recogió por filtración, se secó y se precipitó de nuevo a partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 590 mg (76,5%): punto de fusión: 135-138°C;  $[\alpha]_D^{23}$  -15,5° (c = 0,99%, DMF).

20 Análisis elemental, para C<sub>47</sub>H<sub>57</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>.H<sub>2</sub>O :

Calc.: C 58,19; H 6,13; N 15,89

Encont.: C 58,18; H 6,40; N 15,60

25 d) Preparación de  $\beta$ -Ala-Arg-Sar-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>



En 30 ml de ácido acético se disolvieron 450 mg de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Sar-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica con negro de Pd como catalizador, durante 8 horas. El catalizador se separó por filtración, y el producto de filtración se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 5 ml de agua y se cromatografió sobre una columna (2,6 x 22 cm) de carboximetilcelulosa. Se efectuó una elución por gradiente con disoluciones acuosas 0,005M y 0,2 M de acetato de amonio (700 ml cada vez), con lo que salió el compuesto deseado en las fracciones desde 770 ml a 880 ml. Estas fracciones se reunieron y se liofilizaron obteniéndose 309 mg (70,4%) de un producto blanco esponjoso.

$[\alpha]_D^{22}$  -21,5° (c = 0,46%, agua).

Análisis elemental, para C<sub>39</sub>H<sub>52</sub>O<sub>7</sub>N<sub>10</sub>·2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O·2<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O

Calc.: C 54,53; H 7,03; N 14,79

Encont. : C 54,99; H 6,76; N 14,58

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00; Tyr. 0,88; Phe. 2,02;

$\beta$ -Ala. 0,98; Sar (no se determinó) (contenido de péptido,

78,7%).

#### Ejemplo 12

Producción de Leu-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

a) Preparación de Z-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>



En 20 ml de DMF se disolvieron 700 mg de Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 6 horas, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración y el producto de filtración se enfrió. A este producto de filtración se le añadieron 648 mg de Z-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OH, seguido por la adición de 247 mg de HONB y 285 mg de DCC. La mezcla se agitó durante 20 horas. La DC-urea formada se separó por filtración y la DMF se separó por destilación bajo presión reducida. Al residuo se le añadieron 50 ml de agua, y el polvo resultante se recogió por filtración, se secó y se precipitó de nuevo a partir de DMF-acetato de etilo-éter. Rendimiento 1,05 g (86,5%); punto de fusión: 110-111°C;  $[\alpha]_D^{22}$  - 38,1° (c = 1,0%, DMF).

15 Análisis elemental, para C<sub>52</sub>H<sub>65</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>·2H<sub>2</sub>O  
Calc.: C 59,13; H 6,59; N 14,59  
Encont.: C 59,24; H 6,50; N 14,62

b) Producción de Leu-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

En 20 ml de ácido acético se disolvieron 500 mg de Z-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> y se efectuó una reducción catalítica durante 10 horas, con negro de Pd como catalizador.

El catalizador se separó por filtración y el producto de filtración se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 5 ml de agua



y se cromatografió sobre una columna (2,6 x 20 cm) de carboximetilcelulosa. Se efectuó la elución por gradiente con disoluciones acuosas 0,005M y 0,2M de acetato de amonio (700 ml cada vez), con lo que el compuesto deseado salió en fracciones desde 700 ml a 790. Las fracciones se reunieron y se liofilizaron para obtener 300 mg (63,6%) de un producto blanco esponjoso.

$$[\alpha]_D^{22} -58,3^{\circ} \text{ (c = 0,59\%, agua).}$$

10 Análisis elemental, para  $C_{44}H_{60}O_7N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 2H_2O$

Calc.: C 57,81; H 7,28; N 14,05

Encon.: C 57,72; H 7,24; N 14,25

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,07; Gly. 1,03; Tyr. 0,87;

Phe. 2,07; Phe. 1,00 (contenido

15 de péptido 83,9%).

### Ejemplo 13

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de resina de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Phe-Phe-Phe-Tyr(Bzl).

20 En el recipiente de reacción de un aparato sintetizador de péptidos en fase sólida (Simadzu APS-800, Simadzu Seisakusho, Japón) se colocaron 4,33 g de resina de BOC-Tyr(Bzl)- (contenido de Tyr, 2,18 mM), y, después de hincharla con diclorometano, se introdujeron BOC-Phe-OH, 25 BOC-Phe-OH, BOC-Arg(NO<sub>2</sub>) y Z-beta-Ala-OH, en el orden in-



dicado, por el método DCC, según el método de Merrifield (Véase J.A.C.S, 86, 304, 1964). Una vez completadas todas las reacciones, la resina se lavó con dicloro-metano, DMF, etanol, ácido acético glacial y metanol, y después se secó. El procedimiento anterior produjo 6,55 g de péptido-resina.

b) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Phe-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-NH<sub>2</sub>.

En 50 ml de amoniaco-metanol al 17% se pusieron en suspensión 6,04 g de la resina obtenida en a) anteriormente, y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La resina se separó por filtración y el producto de filtración se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. Al residuo se le añadió éter, y el polvo resultante se recogió por filtración y se secó. Rendimiento 2,43 g.

c) Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Phe-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 30 ml de ácido acético glacial se disolvieron 500 mg de la amida de péptido cruda protegida obtenida en b), y se efectuó una reducción catalítica con negro de Pd como catalizador, durante 10 horas. El catalizador se separó por filtración, y el producto de filtración se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 5 ml de agua, y la disolución se hizo pasar a través de una columna (2,6



x 24,5 cm) de carboximetilcelulosa. Se efectuó una elución por gradiente con disoluciones acuosas 0,005M y 0,2M de acetato de amonio (800 ml cada vez). Las fracciones desde 1180 ml a 1545 ml se reunieron y se lio  
 5 filizaron. Rendimiento 237 mg (64%);  $[\alpha]_D^{24} -33,19^\circ$  (c = 0,46%, agua).

Análisis elemental, para  $C_{45}H_{54}O_7N_9 \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 3H_2O$

Calc.: C 58,44; H 6,81; N 12,52

Encon.: C 58,44; H 6,24; N 12,86

10 Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00; Tyr. 0,81; Phe. 3,20;  $\beta$ -Ala. 0,9 (contenido de péptido, 84,8%).

Ejemplo 14

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Leu-Phe-Phe-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub>.

15 a) Preparación de resina de Z-  $\beta$ -Ala-Arg(Tos)-Leu-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Gly.

En el recipiente de reacción de un aparato sintetizador de péptidos en fase sólida (Simadzu APS-800) se colocaron 4,0 g de resina de BOC-Gly (que contenía 1,7  
 20 miliequivalentes molares de Gly), que después se hinchó con diclorometano durante 20 horas. En el recipiente de reacción se introdujeron BOC-Phe-OH, BOC-Phe-OH, BOC-Leu-OH, Aoc-Arg(Tos)-OH y Z-beta-Ala-OH, por el orden citado, con DCC como agente de condensación y ácido trifluoracético-  
 25 diclorometano (1:1) como agente para la extracción de



BOC. Una vez completadas todas las reacciones, la resina se lavó con diclorometano, DMF, metanol, ácido acético glacial y metanol, y después se secó. Rendimiento 5,09 g

b) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(Tos)-Leu-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-  
5 -Gly-NH<sub>2</sub>.

En 50 ml de amoníaco-metanol al 17% se pusieron en suspensión 4,4 g. de la resina preparada en a) anteriormente, y, después de cerrar herméticamente el recipiente, la suspensión se agitó a temperatura ambiente  
10 durante 48 horas.

La resina se separó por filtración y se lavó con DMF. Los filtrados se reunieron y se concentraron hasta sequedad bajo presión reducida. Al aceite residual se le añadió éter, y el polvo resultante se recogió por  
15 filtración. Rendimiento, 950 mg

c) Preparación de  $\beta$ -Ala-Arg-Leu-Phe-Phe-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub>.

A 500 mg de la amida de péptido cruda protegida preparada en b) se les añadieron 0,5 ml de anisol, y la mezcla se añadió después a 10 ml de fluoruro de hidrógeno.  
20 no. La mezcla se agitó a 0°C durante 60 minutos y el fluoruro de hidrógeno se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 50 ml de agua. La disolución se lavó dos veces con 20 ml de éter, se hizo pasar por una columna (1 x 10 cm) de Amberlite IRA-410  
25 (forma de acetato), y se liofilizó. El producto se disol-

22 APR 1968

vió en 20 ml de agua, y la disolución se hizo pasar por una columna (2,6 x 25 cm) de carboximetilcelulosa. Se efectuó una elución por gradiente usando disoluciones acuosas 0,005M y 0,2M de acetato de amonio (800 ml cada vez). Las fracciones de 1200 ml a 1530 ml se reunieron y se liofilizaron. El procedimiento dió 167 mg de un producto blanco esponjoso.

$$[\alpha]_D^{23} -28,93^{\circ} \text{ (c = 0,6\%, \text{ agua}).}$$

Análisis elemental, para  $C_{44}H_{61}O_8N_{11} \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 3,5H_2O$

Calc.: C 54,64; H 7,26; N 14,60

10                    Encont.: C 54,64; H 7,58; N 14,37

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,06; Gly. 1,00; Leu. 1,11;

Tyr. 0,87; Phe. 2,09; beta-Ala. 1,14

(contenido de péptido 82,0%)

Ejemplo 15

15                    Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Ser-Phe-Phe-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de resina de Z- $\beta$ -Ala-Arg(Tos)-Ser(Bzl)-Phe-Phe-Tyr-(Bzl)-Gly. En el recipiente de reacción de un aparato sintetizador de péptidos en fase sólida (Modelo APS-800 de Simadzu Seisakusho, Japón) se colocaron 4,02 g de resina de BOC-Gly (que contenía 2,17 mmoles de Gly), y se introdujeron BOC-Tyr(Bzl)-OH, BOC-Phe-OH, BOC-Phe-OH, BOC-Ser(Bzl)-OH, Aoc-Arg(Tos)-OH y Z-beta-Ala-OH, en el orden citado, según el método de Merrifield. Una vez completadas todas las reacciones, la resina se lavó con di

20

25                    clorometano, metanol, DMF, ácido acético glacial y metanol,



y después se secó. Rendimiento 6,4 g.

b) Preparación de Z-  $\beta$ -Ala-Arg(Tos)-Ser(Bzl)-Phe-Phe-Tyr  
(Bzl)-Gly-NH<sub>2</sub>.

5 En 50 ml de amoniaco-metanol al 17% se pusie  
ron en suspensión 5,9 g de la resina preparada en a) y la  
suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 48 ho-  
ras. La resina se separó por filtración y se lavó con  
DMF. Los líquidos de lavado se reunieron con el producto  
de filtración y la disolución reunida se concentró hasta  
10 sequedad bajo presión reducida. Al residuo se le añadió  
éter, y el polvo resultante se recogió por filtración.  
Rendimiento 2,02 g.

c) Preparación de  $\beta$ -Ala-Arg-Ser-Phe-Phe-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub>

15 En 10 ml de fluoruro de hidrógeno anhidro se di  
solvió 1,0 g de la amida de péptido cruda protegida prepa-  
rada en b) y 1 ml de anisol, y la disolución se agitó a  
0°C durante 60 minutos. El fluoruro de hidrógeno se se-  
paró por destilación bajo presión reducida, y el residuo  
se disolvió en 20 ml de agua. La disolución se lavó dos  
20 veces con 10 ml de éter, se hizo pasar a través de una  
columna (1,0 x 15 cm) de Amberlite IRA-410, y se liofili-  
zó. El producto se disolvió en 10 ml de agua, y la di-  
solución se hizo pasar sobre una columna (2,5 x 25 cm) de  
carboximetilcelulosa. Se efectuó una elución por gradiente  
25 con disoluciones acuosas 0,005M y 0,2M de acetato de am



nio (800 ml cada vez). Las fracciones desde 800 ml hasta 950 ml se reunieron y se liofilizaron. El producto se hizo pasar después a través de una columna de 2 x 10 cm de Amberlite XAD-2 (resina de poliestireno de Rohm & Haas. Co. Ltd. EE.UU.) (agua) y se liofilizó. El procedimiento dió 55 mg del compuesto antes indicado en forma de un producto blanco esponjoso.  $[\alpha]_D^{24} -30,11^\circ$  (c = 0,47, agua)  
Análisis de aminoácidos: Arg. 1,04; Ser. 0,96; Gly. 1,00; Tyr. 0,88; Phe. 2,10;  $\beta$ -Ala. 0,98 (contenido de péptido, 83,0%)

#### Ejemplo 16

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Pro-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-  
-Ala-OH

En 30 ml de metanol se disolvieron 1,16 g de Z-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys(BOC)-AlaO<sup>t</sup>Bu, y se efectuó una reducción catalítica durante 4 horas, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración y el producto de filtración se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 15 ml de DMF. A esta disolución se le añadieron 492 mg de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro-OH y 200 mg de HONB, y, con enfriamiento, se añadieron 250 mg de DCC. La mezcla se agitó durante 18 horas.

Los materiales insolubles se separaron por



filtración y la DMF se separó por destilación bajo presión reducida. Al residuo se le añadió acetato de etilo, y el polvo resultante se secó y se disolvió en 10 ml. de ácido trifluoroacético. La disolución se dejó reposar durante 40 minutos. El ácido trifluoroacético se separó por destilación bajo presión reducida, y el residuo se disolvió en 30 ml de ácido acético glacial. Se efectuó una reducción catalítica durante 16 horas, con negro de Pd como catalizador.

El catalizador se separó por filtración y el producto de filtración se concentró hasta sequedad bajo presión reducida y se disolvió en 10 ml de agua. Después de un cambio de iones con Amberlite IRA-410, las pequeñas cantidades de materiales insolubles se separaron por filtración, y el producto de filtración se hizo pasar a través de una columna (2,2 x 30 cm) de carboximetilcelulosa. Se efectuó una elución por gradiente con disoluciones acuosas 0,005M y 0,2 M de acetato de amonio (800 ml cada una). Las fracciones desde 820 ml a 1180 ml se reunieron y se liofilizaron. El procedimiento dió 670 mg de un producto blanco esponjoso.

Análisis de aminoácidos: Lys. 1,02; Arg. 0,98; Thr. 0,96;  
Pro. 2,04; Ala. 1,00; Tyr. 0,87;  
Phe. 2,02; beta-Ala. 1,05 (con-



tenido de péptido, 74%).

Ejemplo 17

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Leu-OH

a) Preparación de Z-Phe-Phe-Tyr-OEt.

5 En 30 ml de etanol se disolvieron 3,43 g de  
Z-Phe-Tyr-OEt, y se efectuó una reducción catalítica du-  
rante 2 horas, con negro de Pd como catalizador. El ca-  
talizador se separó por filtración, y el disolvente se  
evaporó por destilación bajo presión reducida. El re-  
10 siduo se disolvió en 15 ml de DMF, y se añadieron 2,77 g  
de Z-Phe-OSu. La mezcla se agitó durante 10 horas. A  
esta mezcla de reacción se le añadieron 80 ml de agua,  
y los cristales resultantes se recogieron por filtra-  
ción, y se recrystalizaron a partir de etanol-acetato  
15 de etilo-éter etílico. El procedimiento produjo 3,72  
g (83,4%) de agujas que fundían a 185-186°C;  $[\alpha]_D^{24}$   
-18,1° (c = 1,09%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{37}H_{39}O_7N_3$ :

Calc.: C 69,68; H 6,16; N 6,59.

20 Encont.: C 69,64; H 6,14; N 6,54.

b) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-OEt.

En 50 ml de etanol se pusieron en suspen-  
sión 2,0 g de Z-Phe-Phe-Tyr-OEt, y se efectuó una reduc-  
ción catalítica durante 1,5 horas, con negro de Pd co-  
25 mo catalizador. El catalizador se eliminó por filtra-

22 100 10.75

5 ción, y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 20 ml de DMF. Con enfriamiento con hielo, se añadieron a la di- solución anterior 1,56 g de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH, 0,7 g de HONB y 0,8 g de DCC, y la mezcla se agitó duran- te 12 horas.

10 El derivado de urea formado se separó por filtración, y la DMF se separó por destilación bajo presión reducida. Al residuo se le añadieron 60 ml de agua, y el polvo resultante se recogió por filtración, se secó y se precipitó de nuevo a partir de DMF-aceta- to de etilo. Rendimiento 2,58 g (82%); punto de fu- sión: 83-85°C;  $[\alpha]_D^{25} = -10,0^\circ$  (c = 1,1%, DMF). Análisis elemental, para C<sub>48</sub>H<sub>58</sub>O<sub>12</sub>N<sub>10</sub>·2H<sub>2</sub>O

15 Calc.: C 57,43; H 6,23; N 13,97  
Encont.: C 57,41; H 6,05; N 14,49

c) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-OH.

20 En 30 ml de acetona se pusieron en suspen- sión 2,00 g de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-OEt, y, enfriando con hielo, se añadieron 6,3 ml de hidró- xido de sodio acuoso 1N. Después, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la adición de 3 ml de ácido clorhídrico 1N, la acetona se separó por destilación bajo presión reducida. Las pe- queñas cantidades de materiales insolubles se separaron



5 por filtración y se añadieron 3,8 ml de ácido clorhídrico 1N. El precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó bien con agua fría y se secó. Rendimiento 1,96 g (98%); punto de fusión 70-73°C;  $[\alpha]_D^{25}$  -8,7° (c = 0,97%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{46}H_{54}O_{12}N_{10} \cdot H_2O$  :

Calc. C 57,77; H 5,90; N 14,64

Encont. C 58,13; H 5,89; N 14,51

10 d) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-Leu-OBzl.

15 En 5 ml de DMF se disolvieron 275 mg de p-toluensulfonato de H-Leu-OBzl, y la disolución se neutralizó con 0,9 ml de N-etilmorfolina—DMF al 10%. Enfriando a -10°C, se añadieron 670 mg de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-OH, 251 mg de HONB y 289 mg de DCC. La mezcla se agitó durante 12 horas, y la DC-urea formada se separó por filtración. La DMF se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadieron al residuo 30 ml de agua. El precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con metanol caliente, y se secó, Rendimiento 703 mg (87,9%); punto de fusión: 178-181°C;  $[\alpha]_D^{23}$  -15,0° (c = 1,02%, DMF).

20 Análisis elemental, para  $C_{59}H_{72}O_{13}N_{11}$  :

Calc.: C 61,98; H 6,35; N 13,49

25 Encont.: C 61,88; H 6,78; N 13,15



e) Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Leu-OH

En 30 ml de ácido acético se disolvieron 500 mg de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-Leu-OBzl, y se efectuó una reducción catalítica durante 8 horas, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración, y el disolvente se evaporó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 5 ml de agua, y la disolución se hizo pasar sobre una columna (2,6 x 18 cm) de carboximetilcelulosa. Se efectuó la elución por el método del gradiente lineal usando acetato de amonio acuoso 0,005M (700 ml) y acetato de amonio acuoso 0,2 M (700 ml), después de lo cual el compuesto antes indicado salió en fracciones desde 370 ml hasta 720 ml. Estas fracciones se reunieron y liofilizaron. Rendimiento 277 mg (64,2%);  $[\alpha]_D^{23}$  -32,5° (c = 0,51%, agua).

Análisis elemental, para C<sub>44</sub>H<sub>60</sub>O<sub>9</sub>N<sub>10</sub>·C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O

Calc.: C 55,97; H 7,15; N 14,19

Encont.: C 55,80; H 7,20; N 14,17.

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00; Gly. 1,04; Leu. 1,08; Phe. 2,16; Tyr. 0,88;  $\beta$ -Ala. 1,04 (contenido de péptido, 85,9%)

Ejemplo 18

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala-NH<sub>2</sub>.

22



Se repitieron los procedimientos descritos en el Ejemplo 17 d) y -e), excepto en que se usó clorhidrato de H-Ala-NH<sub>2</sub> en lugar de p-toluensulfonato de H-Leu-OBzl, con lo que se obtuvo diacetato de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala-NH<sub>2</sub>, con un rendimiento de 216 mg. Análisis de aminoácidos: Arg. 1,01; Gly. 1,00; Ala. 1,02; Phe. 2,00; Tyr. 0,89;  $\beta$ -Ala. 1,12 (contenido de péptido, 82,4%).

10

Ejemplo 19

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Pro-OH

a) Preparación de Z-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-O<sup>t</sup>Bu.

En 30 ml de metanol se disolvieron 1,80 g de Z-Thr-Pro-O<sup>t</sup>Bu, y se efectuó una reducción catalítica durante 5 horas, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración, y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 20 ml de DMF, y, una vez enfriada la disolución a -10°C, se añadieron 2,70 g de Z-Phe-Phe-Tyr-OH, 1,59 g de HONB y 1,37 g de DCC. La mezcla se agitó durante 18 horas. El derivado de urea formado se separó por filtración y se añadieron 100 ml de agua. El precipitado resultante se recogió por filtración, se secó y se disolvió en 100 ml de acetato de etilo. La disolución se lavó dos veces con 50

4-4-75



ml de agua, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. Después, el disolvente se separó por destilación, y se añadió acetato de etilo al residuo. El polvo resultante se recogió por filtración y se secó. Rendimiento 5 2,51 g (89,8%); punto de fusión, 137-139°C;  $[\alpha]_D^{25}$  -44,1° (c = 1,08%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{48}H_{57}O_{10}N_5 \cdot H_2O$ :  
Calc.: C 65,36; H 6,74; N 7,94  
Encont.: C 65,49; H 6,82; N 7,91

10 b) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-O<sup>t</sup>Bu.

En 20 ml de metanol se disolvieron 1,50 g de Z-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-O<sup>t</sup>Bu, y se efectuó una reducción catalítica con negro de Pd como catalizador, en una corriente de hidrógeno, durante 4 horas. El catalizador se separó por filtración, y el disolvente se evaporó por destilación bajo presión reducida. 15

El residuo se disolvió en 10 ml de DMF, y, mientras la disolución se enfriaba con hielo, se añadieron 0,87 g de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH, 0,47 g de HONB, y 0,54 g de DCC. La mezcla se agitó durante 16 horas. La DC-urea formada se separó por filtración y se añadieron al filtrado 50 ml de agua, con lo que se separó un gel. Este precipitado se recogió por filtración, se secó y se precipitó de nuevo a partir de 25



DMF-acetato de etilo. El precipitado se recogió por filtración, y se precipitó después de nuevo a partir de etanol. Rendimiento 1,40 g (67,4%); punto de fusión, 153-156°C;  $[\alpha]_D^{25}$  -32,3° (c = 0,97%, DMF).

5 Análisis elemental, para  $C_{59}H_{76}O_{15}N_{12}$ :

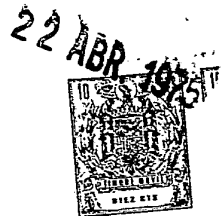
Calc.: C 58,50; H 6,57; N 13,88

Encont.: C 58,24; H 6,54; N 13,87

c) Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-OH

10 A 900 mg de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-O<sup>t</sup>Bu se les añadieron 0,9 ml de anisol, y después se añadieron 10 ml de fluoruro de hidrógeno anhidro. La mezcla se agitó a -4°C durante 30 minutos. El fluoruro de hidrógeno se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadieron al residuo  
15 30 ml de agua.

La disolución se sometió a extracción con 30 ml de éter etílico, y la capa acuosa se hizo pasar a través de una columna (1,0 x 10,0 cm) de Amberlite IRA-410 (forma de acetato), que se lavó con agua. Los  
20 líquidos de lavado acuosos se reunieron con el efluente, y la disolución reunida se liofilizó. El producto se disolvió en 10 ml de agua, y la disolución se hizo pasar a través de una columna (2,2 x 21 cm) de carboximetilcelulosa. Se efectuó una elución por gradiente con acetato de amonio acuoso 0,005M (700 ml) y acetato de  
25



amonio acuoso 0,3M (700 ml), tras lo cual el compuesto deseado salió en las fracciones desde 235 ml a 385 ml. Estas fracciones se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento 476 mg. (57,0%).  $[\alpha]_D^{25} -38,8^{\circ}$  (c = 0,25%, agua)

5

Análisis elemental, para  $C_{47}H_{63}O_{11}N_{11} \cdot C_2H_4O_2 \cdot 5H_2O$

Calc.: C 53,10; H 7,00; N 13,91

Encont.: C 53,27; H 7,04; N 13,82.

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,05; Thr. 1,00; Pro. 1,02;  
10 Gly. 0,95; Tyr. 0,95; Phe. 2,02;  
B-Ala. 0,93 (contenido de péptido, 85,5%)

#### Ejemplo 20

Producción de  $\xi$ -Acap-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-OH

15

a) Preparación de Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt.

A 2,41 g. de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt se añadieron 12 ml de HBr-ácido acético al 25% y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos. A la disolución se le añadió éter etílico y el precipitado resultante se recogió por filtración y se secó sobre hidróxi-  
20 do de sodio.

Por otro lado, 1,33 g de Z- $\xi$ -Acap-OH y 0,99 g de HONB se disolvieron en 5 ml de tetrahidrofurano y, con enfriamiento con hielo, se añadieron 1,14 g de DCC. La mezcla se agitó durante 4 horas, y la diciclohexil

25



urea formada se separó por filtración. El anterior com-  
ponente de amina se disolvió en 10 ml de DMF y, una vez  
neutralizada la disolución con trietilamina, se añadió  
la anterior disolución de éster activo. La mezcla se  
5 agitó durante la noche. El disolvente se separó por  
destilación bajo presión reducida, y el residuo se di-  
solvió en 50 ml de acetato de etilo. La disolución se  
lavó con agua, y después con una disolución acuosa satu-  
rada de bicarbonato de sodio (50 ml x 2). Se lavó con  
10 agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El di-  
solvente se separó por destilación bajo presión redu-  
cida, y al residuo se le añadió éter de petróleo. Los  
cristales resultantes se recristalizan a partir de agua-  
-etanol-acetato de etilo. Rendimiento 2,1 g (76%); pun-  
to de fusión: 85-87°C;  $[\alpha]_D^{24}$  -11,9° (c = 1,0%, DMF).  
15 Análisis elemental, para C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>O<sub>8</sub>N<sub>7</sub>:

Calc. C 52,26; H 6,76; N 17,78

Encont.: C 52,43; H 6,64; N 17,76.

b) Preparación de Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH

20 En 10 ml de acetona se disolvieron 1,8 g de  
Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt, y, después de enfriar con  
hielo, se añadieron 2,9 ml de hidróxido de sodio 2N. La  
mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas.  
A la mezcla se le añadieron 2,5 ml de ácido clorhídrico  
25 1N, y la acetona se separó por destilación. Al residuo  
se le añadieron 10 ml de agua, y, después de separar por



filtración los materiales insolubles, la disolución se hizo ácida con ácido clorhídrico 1N. Los cristales resultantes se recogieron por filtración. Rendimiento 1,59 g (93%); punto de fusión: 97,5-99°C;  $[\alpha]_D^{24} -10,7^\circ$  (c = 1,0%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{22}H_{33}O_8 N_7 \cdot H_2O$  :

Calc.: C 48,79; H 6,52; N 18,10

Encont.: C 48,50; H 6,28; N 18,23

c) Producción de  $\xi$ -Acap-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-OH

En el procedimiento del Ejemplo 19-b), se substituyó Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH por Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH, y se repitieron los mismos procedimientos descritos en el Ejemplo 19-b) y c), obteniéndose 428 mg del compuesto antes indicado.

$[\alpha]_D^{24} -37,9^\circ$  (c = 0,25%, agua).

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,02; Thr. 1,02; Pro. 1,00;  
Gly. 1,01; Phe. 2,04; Tyr. 0,92;

$\xi$ -Acap. (no se determinó) (contenido de péptido, 84,9%).

20

#### Ejemplo 21

Producción de Lys-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-OH

a) Preparación de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt.

Usando 2,07 g de di-Z-Lys-OH, se obtuvo el compuesto indicado en forma de gel, de la misma manera que en el Ejemplo 20-a). El gel se precipitó de nuevo

4-4-75



a partir de agua-etanol-acetato de etilo. Rendimiento 2,57 g (73%); punto de fusión: 161-162°C;  $[\alpha]_D^{24}$  -11,9° (c = 1,0%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{32}H_{44}O_{10}N_8$  :

5                    Calc.: C 54,85; H 6,33; N 15,99  
                       Encont.: C 54,45; H 6,05; N 15,99

b) Preparación de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH.

En 10 ml de acetona se disolvieron 2,0 g de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt, y, bajo enfriamiento con hielo, se añadieron 2,1 ml, de hidróxido de sodio 2N. Después, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de añadir 1,4 ml de ácido clorhídrico 1N, la acetona se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadieron 10 ml de agua al residuo.

15                    Los materiales insolubles se separaron por filtración, y el filtrado se hizo ácido con ácido clorhídrico 1N. Los geles resultantes se recogieron por filtración. Rendimiento 1,78 g (93%); punto de fusión: 131-132,5°C;  $[\alpha]_D^{24}$  -10,5° (c = 1,0%, DMF).

20                    Análisis elemental, para  $C_{30}H_{40}O_{10}N_8 \cdot 3/2H_2O$

                      Calc.: C 51,49; H 6,20; N 16,02  
                       Encont.: C 51,43; H 5,92; N 16,23

c) Preparación de Lys-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-OH.

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 19-b), pero se usó di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH en lugar de Z-β-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH, para producir 452 mg del compuesto antes



indicado.  $[\alpha]_D^{28} -34,8^\circ$  (c = 0,4%, agua).

Análisis de aminoácidos: Lys. 1,08; Arg. 1,01; Thr. 0,92;  
Pro. 1,00; Gly. 1,00; Phe. 2,08;  
Tyr. 0,89 (contenido de pépti  
do, 85,2%).

5

Ejemplo 22

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-  
-Ala-OH.

a) Preparación de Z-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu.

10

En 300 ml de metanol, se disolvieron 14 g de Z-Ala-O<sup>t</sup>Bu, y se efectuó una reducción catalítica durante 2 horas, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración, y el metanol se separó por des-  
tilación.

15

El residuo se disolvió en 50 ml de tetrahi-  
drofurano. Por otro lado, 28,1 g de sal de dicitclohexil-  
amina de Z-Lys(BOC)-OH se pusieron en suspensión en 300 ml  
de acetato de etilo, y se lavaron tres veces con 200 ml  
de ácido sulfúrico 0,5N. Después de lavarla con agua,  
se secó sobre sulfato de sodio anhidro.

20

El acetato de etilo se eliminó parcialmente  
por destilación, hasta llegar a un volumen de aproxima-  
damente 150 ml. El residuo se añadió a la disolución  
anterior en tetrahidrofurano, y después se añadieron 10  
g de HONB. Enfriando con hielo, se añadieron 11,3 g

25

22 ABR 1977

de DCC, y la mezcla se agitó durante 16 horas. La DC-urea formada se separó por filtración, y el líquido de filtración se concentró hasta sequedad. El residuo se disolvió en 500 ml de acetato de etilo, y se lavó con ácido sulfúrico 0,5 N y bicarbonato de sodio acuoso al 4%. Después de lavar bien con agua, la capa de acetato de etilo se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se evaporó hasta sequedad bajo presión reducida y se añadió éter de petróleo, con lo que se separaron cristales. Estos cristales se recogieron por filtración, y se recrystalizaron a partir de acetato de etilo-éter de petróleo. Rendimiento 21,9 g (87%); punto de fusión: 55-57°C;

$[\alpha]_D^{23} -30,17^\circ$  (c = 1,16%, metanol).

Análisis elemental, para  $C_{26}H_{41}O_7N_3$ :

Calc.: C 61,52; H 8,14; N 8,28

Encont.: C 61,61; H 8,10; N 8,18.

b) Preparación de Z-Pro-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu.

En 40 ml de metanol se disolvieron 2,5 g de Z-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu, y se efectuó una reducción catalítica durante 2 horas usando negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración, y el producto de filtración se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 20 ml de acetato de etilo. A esta disolución se le añadieron 2,45 g de Z-Pro-ONB, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente



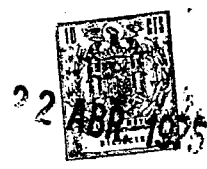
durante 18 horas. A esta disolución se le añadieron 200 ml de acetato de etilo, y la mezcla se lavó con ácido sulfúrico 0,5N y con bicarbonato de sodio acuoso al 4%. Después se lavó tres veces con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y se concentró hasta sequedad bajo presión reducida. Se añadió éter de petróleo al residuo, y los cristales resultantes se recogieron por filtración y se recrystalizaron a partir de acetato de etilo-éter de petróleo. Rendimiento 2,53 g (85%); punto de fusión: 127-129°C;  $[\alpha]_D^{23}$  -64,52° (c = 1,04%, metanol).

Análisis elemental, para  $C_{31}H_{48}O_8N_4$  :  
Calc. C 61,57; H 8,00; N 9,27  
Encont. C 61,81; H 8,31; N 9,37

c) Preparación de Z-Thr-Pro-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu.

En 40 ml de metanol se disolvieron 2,12 g de Z-Pro-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu, y se efectuó una reducción catalítica durante 3 horas, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración y el disolvente se eliminó por destilación bajo presión reducida.

El residuo se disolvió en 20 ml de dioxano. Por otro lado, 977 mg de Z-Thr-OH y 806 mg de HONB se disolvieron en 10 ml de acetato de etilo-dioxano (1:1), y, con enfriamiento con hielo, se añadieron 800 mg de DCC. La mezcla se agitó durante 6 horas, y la DC-urea formada se separó por filtración y el líquido de filtración se



añadió a la anterior disolución en dioxano. La mezcla se agitó durante 16 horas. El disolvente se separó por destilación bajo presión reducida, y el residuo se disolvió en 150 ml de acetato de etilo. La disolución se lavó con ácido sulfúrico 0,5N y con bicarbonato de sodio acuoso al 4%. Después de lavarla con agua, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, y el disolvente se eliminó por destilación bajo presión reducida. Al residuo se le añadió éter de petróleo y el polvo resultante se recogió. Rendimiento 2,3 g (93%); punto de fusión: 64-67°C;  $\left[ \alpha \right]_D^{23} -75,58^\circ$  (c = 0,995, metanol).

Análisis elemental, para  $C_{35}H_{55}O_{10}N_5$  :  
 Calc. C 59,55; H 7,85; N 9,92  
 Encont. C 59,25; H 7,99; N 9,65

d) Preparación de Z-Phe-Phe-Tyr-Pro-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu.  
 En 70 ml de metanol se disolvieron 1,41 g de Z-Thr-Pro-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu, y se efectuó una reducción catalítica durante 2 horas con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración, y el disolvente se eliminó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 10 ml de DMF, y después se añadieron 1,1 g de Z-Phe-Phe-Tyr-OH y 720 mg de HONB. Enfriando con hielo, se añadieron 618 mg de DCC, y la mezcla se agitó durante 20 horas. El disolvente se separó por destilación bajo presión re-



ducida, y el residuo se trató con acetato de etilo-éter (1:1). El polvo resultante se recogió por filtración y se cristalizó a partir de etanol. Rendimiento 2,1 g (100%); punto de fusión: 160-163,5°C;  $[\alpha]_D^{23}$ -63,73° (c = 1,05%, metanol).

5

Análisis elemental, para C H O N :  
 62 80 16 8  
 Calc.: C 62,09; H 7,23; N 9,34  
 Encont.: C 62,02; H 7,14; N 9,64

e) Preparación de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu.

10

En 30 ml de metanol se disolvieron 2,32 g de Z-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu, y se efectuó una reducción catalítica durante 3 horas, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración, y el metanol se separó por destilación. El residuo se disolvió en 5 ml de DMF. A esta disolución se le añadieron 1,26 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-ONB, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La DMF se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadieron al residuo 50 ml de agua. El polvo resultante se recogió por filtración, y se precipitó de nuevo dos veces a partir de DMF-agua. Rendimiento 2,5 g (88%); punto de fusión: 138-141°C (con descomp.);  $[\alpha]_D^{24}$ -32,4° (c = 0,99%, DMF).

15

20

25

Análisis elemental, para C H O N :  
 70 96 18 14



Calc. C 59,14; H 6,81; N 13,80

Encont. C 58,82; H 6,80; N 13,66

f) Preparación de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-  
-Lys-Ala-OH

5                   En 30 ml de una mezcla de metanol y ácido  
acético glacial (2:1) se disolvieron 710 mg de  $\alpha$ -Arg(NO<sub>2</sub>)-  
-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys(BOC)-Ala-O<sup>t</sup>Bu, y se efectuó  
una reducción catalítica durante 8 horas, con negro de  
Pd como catalizador. El catalizador se separó por fil-  
10                   tración, y el filtrado se concentró hasta sequedad bajo  
presión reducida. El residuo se disolvió en 10 ml de  
agua, y la disolución se hizo pasar a través de una co-  
lumna (130 ml) de carboximetilcelulosa. Se efectuó una  
elución por gradiente con acetato de amonio acuoso 0,005M  
15                   y acetato de amonio acuoso 0,2M (800 ml cada vez). Las  
fracciones desde 913 ml a 1190 ml se reunieron y se  
liofilizaron para obtener 350 mg de un producto blanco  
esponjoso.

20                   Este polvo se disolvió en 8 ml de DMF, y  
se añadieron 41 mg de monohidrato de ácido p-toluensul-  
fónico. Después se añadieron 82 mg de BOC-beta-Ala-ONB,  
y la mezcla se agitó durante 16 horas. La DMF se separó  
por destilación bajo presión reducida, y se añadieron al  
residuo 3 ml de ácido trifluoroacético. La mezcla se  
25                   agitó durante 30 minutos, y el ácido trifluoroacético



se separó por destilación. El residuo se disolvió en 10 ml de agua, y se hizo pasar a través de una columna (1,0 x 10 cm) de Amberlite IRA-410 (forma de acetato), con lo que el compuesto se convirtió en el acetato. El producto de elución se liofilizó y se aplicó a una columna (2,2 x 17 cm) de carboximetilcelulosa. Se efectuó una elución por gradiente con acetato de amonio acuoso 0,005M (500 ml) y acetato de amonio acuoso 0,2M (500 ml). Las fracciones desde 430 ml a 500 ml. Se reunieron y se liofilizaron para obtener 250 mg de un producto blanco esponjoso.  $[\alpha]_D^{24} -58,8^{\circ}$  (c = 0,5%, agua).  
 Análisis de aminoácidos: Lys. 1,00; Arg. 1,04; Thr. 1,00; Pro. 1,04; Gly, 1,04; Ala. 1,04; Tyr, 0,89; Phe. 2,00;  $\beta$ -Ala. 0,93 (contenido de péptido, 72%).

Ejemplo 23

Producción de Gly-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-  
 -Ala-OH

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 22-f), excepto en que se sustituyó BOC- $\beta$ -Ala-ONB por BOC-Gly-ONB para obtener 214 mg del compuesto antes indicado en forma de un producto blanco esponjoso.  $[\alpha]_D^{23} -59,2^{\circ}$  (c = 0,4%, agua).

Análisis de aminoácidos: Lys. 1,02; Arg. 1,00; Thr. 1,00;



1975

Pro. 1,01; Gly. 2,00; Ala. 1,03;  
Tyr. 0,87; Phe. 2,04 (contenido  
de péptido, 78%).

Ejemplo 24

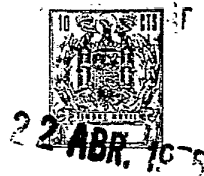
5 Producción de Leu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de resina de Z-Leu-Arg(Tos)-Gly-Phe-Phe-  
Tyr(Bzl)-Gly.

10 En el recipiente de reacción de un apa-  
rato sintetizador de péptidos en fase sólida (Simadzu  
APS-800) se colocaron 4,04 g de resina de BOC-Gly (que  
contenía 1,75 mmoles de Gly), que se hinchó con dicloro  
metano durante 20 horas. Después, según el método de  
Merrifield, se introdujeron BOC-Tyr(Bzl)-OH, BOC-Phe-OH,  
15 BOC-Phe-OH, BOC-Gly-OH, Aoc-Arg(Tos)-OH y Z-Leu-OH, en  
el orden citado. Se usó DCC como agente de condensación,  
y cada aminoácido se usó en cuatro equivalentes, efectuán-  
dose la eliminación de los grupos BOC con ácido trifluo-  
roacético-diclorometano (1:1). La resina se sacó del  
recipiente de reacción y se lavó con diclorometano,  
20 DMF, metanol y ácido acético, y después se secó. El  
procedimiento dió 5,07 g de la resina antes indicada.

b) Preparación de Z-Leu-Arg(Tos)-Gly-Phe-Phe-Tyr-(Bzl)-  
Gly-NH<sub>2</sub>

25 En 50 ml de amoníaco-metanol al 17% se  
pusieron en suspensión, 4,41 g de la resina preparada



en a), y, con cierre hermético, la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. La resina se separó por filtración y se lavó bien con DMF. El líquido de filtración y los  
5 líquidos de lavado se reunieron y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. Al residuo aceitoso se le añadió éter etílico y el polvo resultante se recogió por filtración y se lavó bien con éter. Rendimiento 950 mg.

10 c) Preparación de Leu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Gly-NH<sub>2</sub>

En 10 ml de fluoruro de hidrógeno anhidro se disolvieron 500 mg de la amida de péptido cruda protegida preparada en b) y 0,5 ml de anisol, y la disolución se agitó a 0°C durante  
15 60 minutos. El fluoruro de hidrógeno se separó por destilación, y el residuo se disolvió en 50 ml de agua. La disolución se sometió a extracción dos veces con 20 ml de éter etílico, y la capa acuosa se hizo pasar a través de una columna  
20 (2 x 10 cm) de Amberlite IRA-410 (forma de acetato) y se liofilizó. El producto se hizo pasar a través de una columna (2,3 x 17 cm) de carboximetilcelulosa, y se efectuó una elución por gradiente con acetato de amonio acuoso 0,005M (400  
25 ml) y acetato de amonio acuoso 0,2M (400 ml).



Las fracciones desde 490 ml a 550 ml se reunieron y se liofilizaron. El procedimiento dió 167 mg del compuesto antes indicado en forma de un producto blanco esponjoso.

5 Análisis de aminoácidos: Arg. 1,02; Gly. 2,00; Leu. 1,03; Tyr. 0,89; Phe. 2,08 (contenido de péptido, 84%).

Ejemplo 25

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala-Gly-NH<sub>2</sub>

10 a) Preparación de resina de Z- $\beta$ -Ala-Arg(Tos)-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-Ala-Gly

En el recipiente de reacción de un aparato sintetizador Simadzu APS-800 se colocaron 3,03 g de resina de BOC-Gly (contenido de Gly, 1,32 mM), que después se hinchó con diclorometano. Después se introdujeron BOC-Ala-OH. BOC-Tyr(Bzl)-OH, BOC-Phe-OH, BOC-Phe-OH, BOC-Gly-OH, Aoc-Arg(Tos)-OH y Z-beta-Ala-OH, en el orden citado, por el procedimiento del anhídrido simétrico (Vease Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem. 15 353, 1973 (1972)). La eliminación de BOC en cada operación se hizo por medio de ácido trifluoroacético-diclorometano al 50%.

Además, en cada operación, los grupos amino que no habían reaccionado se acetilaron con anhídrido acético. Una vez introducidos todos los aminoácidos



dos, la resina se lavó con etanol, DMF, diclorometano, ácido acético y metanol, y después se secó bajo presión reducida. El procedimiento dió 3,70 g de resina de péptido.

5 b) Preparación de Z- $\beta$ -Ala-Arg(Tos)-Gly-Phe-Phe-Tyr(Bzl)-  
-Ala-Gly-NH<sub>2</sub>

En 50 ml de amoniaco-metanol al 17% se pusieron en suspensión 3,28 g de la resina de péptidos preparada en a), y, con cierre hermético, la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 40 horas. La resina se separó por filtración y se lavó con 50 ml de DMF. El líquido de filtración y los líquidos de lavado se reunieron y se concentraron hasta sequedad bajo presión reducida. Al residuo se le añadió éter y el polvo resultante se recogió por filtración y se secó. El procedimiento dió 433 mg de la amida de péptido cruda protegida.

15 c) Preparación de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala-Gly-NH<sub>2</sub>.

En una mezcla de 8 ml de fluoruro de hidrógeno anhidro y 0,3 ml de anisol se disolvieron 310 mg de la amida de péptido cruda protegida preparada en b) anteriormente, y la disolución se agitó a 0°C durante 60 minutos.

El fluoruro de hidrógeno se separó por destilación bajo presión reducida, y el residuo se di-



solvió en 50 ml de agua. La disolución se sometió a extracción dos veces con 10 ml de éter. La capa acuosa se hizo pasar a través de una columna (1 x 10 cm) de Amberlite IRA-410 (forma de acetato), que se lavó con agua. El efluente y los líquidos de lavado se reunieron y la disolución reunida se liofilizó. El producto se disolvió en 10 ml de agua y la disolución se hizo pasar a través de una columna (2,3 x 17 cm) de carboximetilcelulosa. Se efectuó una elución por gradiente con disoluciones acuosas 0,005M y 0,2M de acetato de amonio (400 ml cada una). Las fracciones desde 495 ml a 540 ml se reunieron y se liofilizaron, obteniendo 134 mg del producto antes indicado.  $[\alpha]_D^{23} -19,62^{\circ}$  (c = 0,53%, agua).

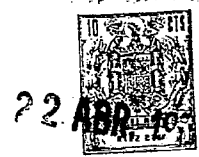
Análisis de aminoácidos: Arg. 1,05; Gly. 1,95; Ala. 1,00; Tyr. 0,86; Phe. 1,98;  $\beta$ -Ala. 1,02 (contenido de péptidos, 84%).

Análisis elemental, para  $C_{43}H_{58}O_9N_{12} \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 4H_2O$   
Calc.: C 52,31; H 5,91; N 15,57  
Encont.: C 52,40; H 6,55; N 15,66

#### Ejemplo 26

Producción de  $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Ala-Gly-NH<sub>2</sub>.

Se repitió el procedimiento del Ejemplo



25, salvo que, como aminoácido a introducir finalmente, se usó di-Z- $\alpha$ ,  $\gamma$ -Abu-OH en lugar de Z-beta-Ala-OH. El procedimiento dió el compuesto antes indicado en forma de un producto blanco esponjoso.  $[\alpha]_D^{21} -20,3^a$  (c = 0,2%, agua).

5

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00; Gly. 1,89; Ala. 1,02; Tyr. 0,88; Phe. 2,00;  $\alpha$ ,  $\gamma$ -Abu. 1,04 (contenido de péptido 81,5%).

10

Ejemplo 27

Producción de Gly-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de Z-Gly-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.

15

A 0,80 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> se le añadieron 8 ml de HBr-ácido acético al 25%, y la mezcla se agitó bien a temperatura ambiente durante 45 minutos. A la mezcla de reacción se le añadieron 100 ml de éter, y el polvo resultante se recogió por filtración y se secó sobre hidróxido de sodio en lentejas en un desecador, bajo presión reducida, durante 2 días. El producto seco se disolvió en 10 ml de DMF, y la disolución se neutralizó con trietilamina. A la disolución se añadieron 0,43 g de Z-Gly-ONB y la mezcla se agitó durante 10 horas.

20

25

A la disolución se añadieron 7 ml de agua, con lo que se separó un aceite. Después de separar por



5 decantación el líquido que sobrenadaba, se añadieron 50 ml de agua. El polvo resultante se recogió por filtración y se secó. Este producto se purificó por reprecipitación con DMF-acetato de etilo. Rendimiento 0,66 g (77%); punto de fusión: 119-122°C;  $[\alpha]_D^{21}$  -24,6° (c = 1,01%, DMF).

Análisis elemental,  $C_{36}H_{44}O_9N_{10} \cdot H_2O$  :

Calc.: C 55,51; H 5,95; N 17,99

Encont.: C 55,95; H 5,90; N 17,73

10 b) Preparación de Gly-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

15 En 30 ml de ácido acético se disolvieron 500 mg de Z-Gly-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 7 horas en corrientes de hidrógeno, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración y el ácido acético se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 10 ml de agua y la disolución se hizo pasar a través de una columna (1,8 x 10 cm) de carboximetilcelulosa.

20 Se efectuó una elución por el método del gradiente lineal usando acetato de amonio acuoso 0,1M (700 ml) y acetato de amonio acuoso 1M (700 ml). Las fracciones desde 410 ml a 515 ml se reunieron y liofilizaron para obtener 307 mg (65%) de producto blanco esponjoso.  $[\alpha]_D^{22}$  -17,7° (c = 0,48%, agua).

25



Análisis de aminoácidos (hidrólisis con HCl). Arg. 1,15;  
Gly. 2,00; Phe. 2,00 (contenido  
de péptido, 84,6%).

Análisis elemental, para  $C_{28}H_{39}O_5N_9 \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 2H_2O$

5

Calc.: C 52,09; H 6,97; N 17,09

Encont.: C 52,05; H 6,85; N 17,22.

Ejemplo 28

Producción de D-Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de Z-D-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

10

En 8 ml de HBr-ácido acético al 25% se  
disolvieron 0,80 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y  
la disolución se agitó a temperatura ambiente durante  
40 minutos. A la mezcla se le añadieron 100 ml de  
éter etílico, tras lo que se formaron precipitados.

15

Los precipitados se recogieron por filtración, se la-  
varon con éter y se secaron. Este producto seco se  
disolvió en 10 ml de DMF y la disolución se neutralizó  
con trietilamina, y después se añadieron 0,51 g de  
Z-D-Ala-ONB. La mezcla se agitó durante 8 horas. La  
DMF se separó por destilación bajo presión reducida,  
y se añadieron 50 ml de agua al residuo.

20

El polvo resultante se recogió por fil-  
tración. Después de secarlo, el polvo se lavó con  
acetato de etilo caliente y se precipitó de nuevo a  
partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 0,799 g

25



(92%); punto de fusión: 223-225°C;  $[\alpha]_D^{21}$  -22,3°

(c = 0,98%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{37}H_{46}O_9N_{10} \cdot 1/2H_2O$  :

Calc. C 56,69; H 6,04; N 17,87

5                    Encont. C 56,38; H 6,07; N 17,98

b) Preparación de D-Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.

En 30 ml. de ácido acético se disolvieron  
600 mg de L-D-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y se efec-  
tuó una reducción catalítica durante 7 horas, con negro  
10 de Pd como catalizador. El catalizador se separó por  
filtración y el disolvente se separó por destilación  
bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 10 ml  
de agua, y la disolución se hizo pasar a través de una  
columna (1,8 x 11 cm) de carboximetil-sephadex.

15                    Se efectuó una elución por gradiente lineal  
con acetato de amonio acuoso 0,1M (700 ml) y acetato de  
amonio acuoso 1M (700 ml), tras lo cual el compuesto an-  
tes indicado salió en fracciones desde 350 ml a 450 ml.  
Estas fracciones se reunieron y se liofilizaron. El  
20 procedimiento dió 400 mg (73%) de un producto blanco  
esponjoso.  $[\alpha]_D^{22}$  -22,2° (c = 0,51%, agua).

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,01; Gly. 1,03; Ala. 1,00;  
Phe. 1,99 (contenido de péptido,  
82,3%)

25                    Análisis elemental, para  $C_{29}H_{41}O_5N_9 \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 2H_2O$

22  
ABR 1975

Calc.: C 52,72; H 7,11; N 16,77

Encont.: C 52,66; H 6,92; N 16,82

Ejemplo 29

Producción de Phe-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de Z-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

5 En 10 ml de HBr-ácido acético al 25% se disolvieron 800 mg de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> y la disolución se agitó durante 50 minutos. A la disolución se le añadieron 80 ml de éter, y los precipitados resultantes se recogieron por filtración, se secaron y se disolvieron en 10 ml de DMF. La disolución se neutralizó con trietilamina, y después se añadieron 700 mg de Z-Phe-OPCP (éster de pentaclorofenilo). La mezcla se agitó durante 10 horas y se añadieron 50 ml de amoníaco acuoso.1N. La capa aceitosa se tomó por decantación, y se añadió agua a la sustancia aceitosa. El polvo resultante se recogió por filtración y se secó. Después de añadir 50 ml de acetato de etilo al polvo, la mezcla se calentó y el polvo se recogió por filtración estando caliente. El polvo se purificó por reprecipitación a partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 805 mg (92%);

$$\left[ \alpha \right]_D^{21} -29,0^\circ \quad (c = 1,0\%, \text{ DMF}).$$

Análisis elemental, para C<sub>43</sub>H<sub>50</sub>O<sub>9</sub>N<sub>10</sub>·1/2H<sub>2</sub>O.

Calc.: C 60,06; H 5,98; N 16,29

Encont.: C 60,32; H 6,02; N 16,10

25 b) Preparación de Phe-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

22 ABR 1975

En 6 ml de fluoruro de hidrógeno anhidro se disolvieron 500 mg de Z-Phe-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> y la disolución se agitó a -10°C durante 40 minutos. El fluoruro de hidrógeno se separó por destilación y el residuo se disolvió en 10 ml de agua. La disolución se hizo pasar a través de una columna (0,9 x 15 cm) de Amberlite IRA-410 (forma de acetato) que se lavó con agua. El efluente se reunió con los líquidos de lavado y la disolución reunida se liofilizó. El procedimiento dió 402 mg del compuesto antes indicado. Análisis de aminoácidos: Arg. 1,01; Gly. 0,98; Phe. 2,94

(contenido de péptido 86,2%)  
Ejemplo 30

Producción de Leu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Preparación de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.

En 100 ml de DMF se disolvieron 12,2 g de Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 20 horas, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración, y se añadieron 8,6 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH y 4,3 g de HONB.

Enfriando con hielo, se añadieron después 4,95 g de DCC. La mezcla se agitó durante 12 horas. La DC-urea formada se separó por filtración, y se añadió 1 litro de agua al líquido de filtración. Los geles resultantes se recogieron por filtración y se precipitaron de nuevo a partir de metanol y agua. Rendimiento

4-5-75

- 75 -



16,25 g (91,8%).

Punto de fusión: 181-184°C;  $[\alpha]_D^{24}$  -16,0° (c = 1,01%, DMF).

Análisis elemental, para  $C_{43}H_{50}O_{10}N_{10} \cdot H_2O$

5 Calc.: C 58,35; H 5,92; N 15,83

Encont.: C 58,02; H 5,98; N 15,66

b) Preparación de Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

En 30 ml de ácido acético se disolvieron  
600 mg de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó  
10 una reducción catalítica durante 9 horas, con negro de  
Pd como catalizador. El catalizador se separó por fil-  
tración y el disolvente se separó por destilación bajo  
presión reducida. El residuo se disolvió en 15 ml de  
15 agua, y se purificó por medio de una columna (1,3 x 11  
cm) de carboximetil-sephadex. Se efectuó una elución  
por gradiente lineal con acetato de amonio acuoso 0,1M  
(500 ml) y acetato de amonio acuoso 1M (500 ml). Las  
fracciones desde 250 ml a 420 ml se reunieron y se liq-  
filizaron. Rendimiento 416 mg (72,5%).  $[\alpha]_D^{25}$  -7,6°  
20 (c = 0,49%, agua).

Análisis elemental, para  $C_{37}H_{47}O_6N_9 \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 2H_2O$

Calc.: C 55,37; H 7,03; N 14,90

Encont.: C 55,81; H 6,83; N 14,78

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,02; Gly. 1,00; Tyr. 0,91;

25 Phe. 2,02 (contenido de

22 

péptido 82,5%).

c) Preparación de Z-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>.

A 700 mg de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> se añadieron 0,2 ml de anisol, seguido por la adición de 7 ml de HBr-ácido acético al 25%. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos, y después se añadieron 100 ml de éter etílico. Los precipitados resultantes se recogieron por filtración, se secaron y se disolvieron en 10 ml de DMF. La disolución se neutralizó con trietilamina, y después se añadieron 344 mg de Z-Leu-Osu (éster de N-hidroxisuccinimida). La mezcla se agitó durante 12 horas. La DMF se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadieron al residuo 50 ml, de agua. El polvo resultante se recogió por filtración y se purificó por reprecipitación a partir de metanol y agua. Rendimiento 560 mg (70,9%); punto de fusión: 193-195°C;  $[\alpha]_D^{22}$  -18,9° (c = 1,13%, DMF).

Análisis elemental, para C H O N .H O  
49 61 11 11 2

Calc.: C 58,96; H 6,36; N 15,44

Encont.: C 58,72; H 6,22; N 15,36

d) Preparación de Leu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 30 ml de ácido acético se disolvieron 400 mg de Z-Leu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 10 horas, con negro de Pd como catalizador. El catalizador se separó por fil-



tración y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 5 ml de agua, y la disolución se hizo pasar a través de una columna (2,6 x 22 cm) de carboximetilcelulosa.

5 Se efectuó una elución por gradiente con acetato de amonio acuoso 0,005 M (700 ml) y acetato de amonio acuoso 0,2 M (700 ml). Las fracciones desde 830 ml. a 910 ml se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento, 217 mg (55,5%);  $[\alpha]_D^{22}$  -14,9° (c = 0,47%,  
10 agua).

Análisis elemental, para  $C_{41}H_{56}O_7N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 3H_2O$

Calc.: C 55,43; H 7,24; N 14,37

Encont.: C 55,71; H 7,12; N 14,81

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,03; Gly. 1,00; Leu. 1,00;

15 Phe. 2,00; Tyr. 0,85 (contenido de péptido, 78,0%)

#### Ejemplo 31

Producción de  $\alpha$ -Abu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

Se repitió el procedimiento del Ejemplo

20 30, pero se usó Z- $\alpha$ -Abu en lugar de Z-Leu, para obtener el compuesto buscado.  $[\alpha]_D^{22}$  -13,6° (c = 0,32%, agua).

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,02; Gly. 0,98;  $\alpha$ -Abu.

1,04; Phe. 2,00; Tyr. 0,92

(contenido de péptido, 81%)

25

#### Ejemplo 32

22 APR 1975

Producción de Nle-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

Se repitió el procedimiento del Ejemplo 30, excepto en que se usó Z-Nle en lugar de Z-Leu, para obtener el compuesto buscado.  $[\alpha]_D^{24} -14,3^{\circ}$  (c = 0,4%, agua).

5

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00; Gly. 0,97; Nle. 1,04; Phe. 2,03; Tyr. 0,91 (contenido de péptido, 84%).

Ejemplo 33

10

Producción de Val-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

15

20

25

En 10 ml de DMF se disolvieron 400 mg del diacetato de Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> preparado en el Ejemplo 30-b), seguido por la adición de 300 mg de Z-Val-ONB. La disolución se neutralizó con trietilamina y se agitó durante 10 horas. A la disolución se le añadieron 50 ml de éter, y los precipitados resultantes se recogieron por filtración, se lavaron con acetato de etilo y se secaron. Este producto se disolvió en 30 ml de ácido acético-agua (1:1), y se efectuó una reducción catalítica con negro de Pd como catalizador, durante 4 horas. El catalizador se separó por filtración, y el líquido de filtración se concentró hasta sequedad. El residuo se disolvió en 10 ml de agua y se purificó por cromatografía de la misma manera que en el Ejemplo 30-c).



Rendimiento 360 mg;  $[\alpha]_D^{22}$   $-13,7^\circ$  (c = 0,5%, agua).  
Análisis de aminoácidos: Arg. 1,02; Gly. 1,00; Val. 0,97;  
Phe. 2,04; Tyr. 0,97 (contenido  
de péptido, 86,2%).

5

Ejemplo 34

Producción de beta-Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Producción de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt.

En 200 ml de tetrahidrofurano se disolvieron  
70,7 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH, y, con enfriamiento con hielo,  
se añadieron 40,5 g de 2,4-dinitrofenol y 45,4 g de DCC.  
La mezcla se agitó durante 4 horas. Por otro lado, 30,7  
g de Gly-OEt.HCl se pusieron en suspensión en 200 ml de  
tetrahidrofurano, y, con enfriamiento con hielo, la sus-  
pensión se neutralizó con 30,8 ml de trietilamina. La  
dodiclohexilurea formada se separó por filtración, y la  
disolución de éster activo preparada anteriormente se  
añadió al líquido de filtración, y después se agitó du-  
rante la noche. La disolución se concentró y el residuo  
se disolvió en 500 ml de acetato de etilo. La disolución  
se lavó con una disolución acuosa saturada de bicarbonato  
de sodio (200 ml x 3), con ácido clorhídrico 1N (200 ml  
x 3), y después con una disolución acuosa saturada de  
cloruro de sodio 200 ml x 3), seguido por secado sobre  
sulfato de sodio anhidro. La disolución se concentró  
y se cristalizó a partir de acetato de etilo-éter de

4-4-75



petróleo. Los cristales se recuperaron por filtración y se recrystalizaron a partir de acetato de etilo-éter de petróleo. Rendimiento 70,0 g (79,8%); punto de fusión: 109-110°C;  $[\alpha]_D^{26,5} -3,4^\circ$  (c = 1%, DMF).

5 Análisis elemental: Calc. para  $C_{18}H_{26}O_7N_6$ : C 49,31; H 5,98; N 19,17

Encontrado: C 49,26; H 5,79; N 18,55.

b) Producción de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH.

10 En 100 ml de acetona se pusieron en suspensión 20,0 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt y, con enfriamiento con hielo, se añadieron 64 ml de disolución acuosa 1N de hidróxido de sodio. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas.

15 Después de neutralizar el álcali en exceso con ácido clorhídrico, la disolución se concentró bajo presión reducida y se añadieron al residuo 100 ml de agua. Los materiales insolubles se separaron por filtración. El producto de filtración se hizo ácido con ácido clorhídrico, y los cristales resultantes se recuperaron por filtración. Rendimiento 18,3 g (93,7%); punto de fusión: 103-105°C;  $[\alpha]_D^{22} -25,9^\circ$  (c = 0,9%, DMF).

20 Análisis elemental: Calc. para  $C_{16}H_{22}O_7N_6 \cdot H_2O$ : C 44,86; H 5,65; N 19,62.

Encontrado: C 44,48; H 5,35; N 19,53

25 c) Producción de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

22 APR 1977

En una mezcla de 60 ml de DMF y 40 ml de metanol se disolvieron 8,91 g de Z-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una hidrogenación catalítica durante 14 horas, en presencia de negro de paladio. El catalizador se separó por filtración y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 30 ml de DMF. Por otro lado, 6,80 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH se añadieron a 50 ml de tetrahidrofurano, y, con enfriamiento con hielo, se añadieron 3,23 g de HONB y 3,71 g de DCC, y después se agitó durante 5 horas. La dicitclohexilurea formada se separó por filtración, y se añadió el anterior componente de amina (H-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>). La mezcla se agitó durante la noche. Una vez que el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida, se añadieron 100 ml de agua al residuo, y el polvo resultante se recogió por filtración.

Después de secarlo, el producto se lavó con acetato de etilo y se recristalizó a partir de etanol-acetato de etilo. Rendimiento 8,34 g (72,7%); punto de fusión: 112-113°C;  $[\alpha]_D^{22} -21,6^\circ$  (c = 1%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para C<sub>34</sub>H<sub>41</sub>O<sub>8</sub>N<sub>9</sub>.H<sub>2</sub>O :

C 56,58; H 6,01; N 17,47

Encontrado: C 56,75; H 5,72; N 17,40

d) Producción de Z-β-Ala-ONB.



En 40 ml de tetrahidrofurano se disolvieron 3,35 g de Z- $\beta$ -Ala-OH y 3,23 g de HONB, y, después de enfriar con hielo, se añadieron 3,71 g de DCC. La mezcla se agitó durante la noche, y la dicitclohexilurea formada se separó por filtración. El disolvente se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadió éter de petróleo. Los cristales resultantes se recuperaron por filtración y se recrystalizaron a partir de acetonitrilo. Rendimiento 3,83 g (66,4%); punto de fusión: 125-126°C.

Análisis elemental: Calc. para C H O N :  
20 20 6 2

C 62,49; H 5,24; N 7,29

Encontrado: C 62,52; H 5,18; N 7,29.

a) Producción de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.

A 1,06 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> se añadieron 10 ml de HBr-ácido acético al 25%, y, después de agitar a temperatura ambiente durante 40 minutos, se añadió éter etílico. El precipitado resultante se recuperó por filtración, se secó bajo presión reducida en un desecador sobre hidróxido de sodio, y se disolvió en 10 ml de DMF. Después de enfriarla, la disolución se neutralizó con 0,84 ml de trietilamina y después se añadieron 0,69 g de Z- $\beta$ -Ala-ONB. La mezcla se agitó durante la noche y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida, y después se añadieron

22 ABR 1977

50 ml de agua. El polvo resultante se secó, se lavó con acetato de etilo y se precipitó de nuevo a partir de agua-dioxano-acetato de etilo. Rendimiento 0,98 g (83,3%); punto de fusión: 161-163°C;  $[\alpha]_D^{21,5} -20,9^\circ$  (c = 0,9%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{37}H_{46}O_9N_{10} \cdot 1/2H_2O$ :  
C 56,69; H 6,04; N 17,89  
Encontrado: C 56,84; H 5,88; N 17,50

f) Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

10 En 40 ml de ácido acético se disolvieron 800 mg de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, juntamente con Pd como catalizador, y se efectuó una reducción catalítica durante 14 horas. El catalizador se separó por filtración y el disolvente se eliminó por destilación bajo presión reducida. El residuo se aplicó sobre una columna (2,5 x 9 cm) de carboximetil-sephadex, y se efectuó la elución por el método de gradiente lineal, desde acetato de amonio acuoso 0,01N (700 ml) hasta acetato de amonio acuoso 1N (700 ml).

20 Las fracciones desde 780 ml a 990 ml se reunieron y seliofilizaron. Rendimiento 500 mg (66%);  $[\alpha]_D^{23,5} -13,9^\circ$  (c = 0,5%, agua).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{29}H_{41}O_5N_2 \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot H_2O$  :  
C 54,00; H 7,01; N 17,18  
25 Encontrado: C 53,75; H 7,07; N 17,15.



Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00 (1); Gly. 1,00 (1);  
Phe. 2,00 (2) (las cifras entre  
paréntesis indican los valores  
teóricos, y lo mismo se aplica  
en lo que sigue). Contenido de  
péptido: 76%.

5

Ejemplo 35

Producción de  $\gamma$ -Abu-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Producción de Z- $\gamma$ -Abu-ONB

10

En 40 ml de tetrahidrofurano se disolvieron  
4,75 g de Z- $\gamma$ -Abu-OH y 3,94 g de HONB, y, después de  
enfriar con hielo, se añadieron 4,54 g de DCC. La mezcla  
se agitó durante 6 horas, y la diciclohexilurea formada  
se separó por filtración. El disolvente se separó des-  
pués por destilación bajo presión reducida, y se añadieron  
al residuo 30 ml de éter etílico, y después se añadió una  
pequeña cantidad de agua. Los cristales resultantes se  
recuperaron por filtración. Rendimiento 6,0 g (75,3%);  
punto de fusión: 66,69°C.

15

20

Análisis elemental: Calc. para C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> :

C 63,31; H 5,57; N 7,03

Encontrado: C 63,39; H 5,42; N 7,06

b) Producción de Z- $\gamma$ -Abu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

Del mismo modo que en el Ejemplo 34-e),

25

0,53 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> se trataron con

22 ABR 1976

HBr-ácido acético y se disolvieron en 15 ml de DMF. Después de neutralizar la disolución con trietilamina, se añadieron 0,44 g de Z- $\gamma$ -Abu-ONB. La mezcla se agi-  
5 tó durante la noche. El disolvente se separó por desti-  
lación bajo presión reducida, y se añadió agua. El pol-  
vo resultante se recuperó por filtración y se secó bien.

Se lavó con acetato de etilo y se precipi-  
tó de nuevo a partir de etanol-agua. Rendimiento 0,38 g  
(65%); punto de fusión: 167-170°C;  $[\alpha]_D^{26,5}$  -21,2°  
10 (c = 1,0%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{38}H_{48}O_9N_{10} \cdot 1/2H_2O$ :

C 57,20; H 6,19; N 17,56

Encontrado: C 57,14; H 6,10; N 17,56

c) Producción de  $\gamma$ -Abu-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

15 En 30 ml de ácido acético se disolvieron  
300 mg de Z- $\gamma$ -Abu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y, con Pd  
como catalizador, se efectuó una reducción catalítica  
durante 6 horas.

Después de separar el catalizador por fil-  
20 tración, el disolvente se separó por destilación bajo  
presión reducida, y el residuo se aplicó sobre una co-  
lumna (1,8 x 10 cm) de carboximetil-sephadex. Después  
se efectuó una elución por el método del gradiente li-  
neal, con acetato de amonio acuoso 0,005N (350 ml) y  
25 acetato de amonio acuoso 1N (350 ml), y las fracciones



de 290 ml a 340 ml se reunieron y se liofilizaron.

Rendimiento 180 mg (63%);  $[\alpha]_D^{26} -15,0 \pm$  (c = 0,5%,  
agua).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{30}H_{43}O_5N_9 \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 3/2H_2O$ :

5

C 53,95; H 7,19; N 16,66

Encontrado: C 53,93; H 7,29; N 16,34

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00 (1); Gly. 1,00 (1);

Phe. 1,94 (2); contenido de

péptido 76%.

10

#### Ejemplo 36

Producción de  $\delta$ -Aval-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Producción de Z- $\delta$ -Aval-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

Del mismo modo que en el Ejemplo 34-e),

0,80 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> se trataron con HBr-

15

-ácido acético y se disolvieron en 10 ml de DMF. La di-

solución se neutralizó con trietilamina. Por otro lado,

0,30 g de Z- $\delta$ -Aval-OH y 0,24 g de HONB se disolvieron

en 5 ml de tetrahidrofurano.

Enfriando con hielo al mismo tiempo, se

20

añadieron 0,27 g de DCC, y la mezcla se agitó durante

3 horas. La dicitclohexilurea se separó por filtración,

y el líquido de filtración se añadió al anterior com-

ponente de amina, H- $\delta$ -Aval-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>,

seguido por agitación durante la noche. El disolvente

25

se separó por destilación bajo presión reducida y se



añadió agua. El polvo resultante se recuperó por fil  
tración y se secó bien. Se lavó con acetato de etilo  
 y se precipitó de nuevo a partir de acetato de etilo.  
 Rendimiento 0,62 g (70%); punto de fusión: 154-157°C;  
 $[\alpha]_D^{23} -13,0^\circ$  (c = 1,0%, DMF).

5

Análisis elemental: Calc. para  $C_{39}H_{50}O_9N_{10} \cdot 1/2H_2O$  :  
 C 57,69; H 6,33; N 17,25  
 Encontrado: C 57,84; H 6,42; N 16,86.

b) Producción de  $\delta$ -Aval-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.

10

En 30 ml de ácido acético se disolvieron  
 500 mg de  $Z$ -Aval-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y se efectuó  
 una reducción catalítica durante 5 horas, con Pd como  
 catalizador. Después de separar el catalizador por fil  
tración, el disolvente se separó por destilación bajo  
 presión reducida. El residuo se aplicó a una columna  
 de carboximetil-sephadex (1,8 cm x 9 cm) y se efectuó  
 la elución por el método del gradiente lineal, con  
 acetato de amonio acuoso 0,1N (500 ml) y acetato de  
 amonio acuoso 1N (500 ml). Las fracciones desde 290  
 ml a 370 ml se reunieron y se liofilizaron. Rendi-  
 miento 290 mg (61%);  $[\alpha]_D^{23} -12,6^\circ$  (c = 0,5%,  
 agua).

15

20

Análisis elemental: Calc. para  $C_{31}H_{45}O_5N_9 \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 3/2H_2O$  :  
 C 53,53; H 7,32; N 16,36

25

Encontrado: C 54,34; H 7,35; N 16,20



Análisis de aminoácidos: Arg. 1,11 (1); Gly. 1,00 (1);  
Phe. 2,04 (2); contenido de  
péptido: 81,4%

Ejemplo 37

- 5 Producción de  $\xi$ -Acap-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>  
a) Producción de Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>  
De la misma manera que en el Ejemplo 34-e),  
0,80 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> se trataron con  
HBr-ácido acético y se disolvieron en 10 ml de DMF.  
10 La disolución se neutralizó con trietilamina. Por  
otro lado, 0,32 g de Z- $\xi$ -Acap-OH y 0,24 g de HONB se  
disolvieron en 5 ml de tetrahidrofurano, y, enfriando  
al mismo tiempo con hielo, se añadieron 0,27 g de DCC.  
La mezcla se agitó durante 3 horas, y la dicitclohexilurea  
15 formada se separó por filtración, y el producto de fil-  
tración se añadió al anterior componente de amina, H-Arg  
(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>). La mezcla se agitó durante la  
noche. El disolvente se separó por destilación bajo  
presión reducida, y se añadió agua. El polvo resultan-  
20 te se recuperó por filtración y se secó bien. Después  
se lavó con acetato de etilo y se recristalizó a partir  
de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 0,49 g (55%);  
punto de fusión: 102-104°C;  $[\alpha]_D^{21}$  -20,0° (c = 1,0%,  
DMF).  
25 Análisis elemental: Calc. para C<sub>39</sub>H<sub>50</sub>O<sub>9</sub>N<sub>10</sub>·1/2H<sub>2</sub>O :



C 57,69; H 6,33; N 17,25

Encontrado: C 57,86; H 6,40; N 16,76

b) Producción de  $\Sigma$ -Acap-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

5 En 30 ml de ácido acético se disolvieron 400 mg de Z-epsilon-Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y, con Pd como catalizador, se efectuó una reducción catalítica durante 7 horas. El catalizador se separó por filtración, y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se aplicó a una columna (1,8 cm x 10 cm)

10 de carboximetilsephadex, y se llevó a cabo una elución por el método del gradiente lineal, a partir de acetato de amonio acuoso 0,1N (500 ml) y acetato de amonio acuoso 1N (500 ml). Las fracciones de 250 ml a 330 ml se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento 200 mg (51%);  $[\alpha]_D^{22}$  -9,9° (c = 6%, agua).

15

Análisis elemental: Calc. para C<sub>32</sub>H<sub>47</sub>O<sub>5</sub>N<sub>9</sub>·2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O :  
C 54,46; H 7,49; N 15,88

Encontrado: C 54,24; H 7,26; N 15,76

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00 (1); Gly. 0,98 (1);  
20 Phe. 2,00(2);  $\Sigma$ -Acap: no se determinó; contenido de péptido, 79%.

Ejemplo 38

Producción de Lys-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

25 a) Producción de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>



De la misma manera que en el Ejemplo 34-e), 0,80 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> se trataron con HBr-ácido acético, y después se disolvieron en 10 ml de DMF. La disolución se neutralizó con trietilamina.

5 Por otro lado, 0,54 g de di-Z-Lys-OH y 0,26 g de HONB se disolvieron en 5 ml de tetrahidrofurano, y, enfriando al mismo tiempo con hielo, se añadieron 0,30 g de DCC. La mezcla se agitó durante 4 horas y la diciclohexilurea formada se separó por filtración. El líquido de filtración se añadió al anterior componente de amina, 10  $[H-Arg(NO_2)-Gly-Phe-Phe-NH_2]$ , seguido por agitación durante la noche. El disolvente se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadió agua al residuo. El polvo resultante se recuperó por filtración y se secó 15 bien. Después se lavó con acetato de etilo y se precipitó de nuevo a partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 0,82 g (77%); punto de fusión: 200-204°C (con descomp.).  $[\alpha]_D^{23} -20,5^\circ$  (c = 1,1%, DMF).

20 Análisis elemental: Calc. para C<sub>48</sub>H<sub>59</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>·1/2H<sub>2</sub>O :

C 59,06; H 6,20; N 15,79

Encontrado: C 59,04; H 6,13; N 15,78

b) Producción de Lys-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

25 En 30 ml de ácido acético se disolvieron 600 mg de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> y, con Pd como catalizador, se efectuó la reducción catalítica durante



6 horas. El catalizador se separó por filtración y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se aplicó sobre una columna (1,5 cm x 11 cm) de carboximetilsephadex, y se efectuó la elución por el método del gradiente lineal con acetato de amonio acuoso 0,1N (700 ml) y acetato de amonio acuoso 1N (700 ml). Las fracciones desde 650 ml a 760 ml se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento 280 mg (52%);  $[\alpha]_D^{23}$  -4,3° (c = 0,5%, agua).

10 Análisis elemental: Calc. para  $C_{32}H_{48}O_5N_{10} \cdot 3C_2H_4O_2 \cdot 2H_2O$  :  
C 52,52; H 7,42; N 16,12

Encontrado: C 52,64; H 7,38; N 16,42.

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,06 (1); Lys. 1,09 (1);  
Gly. 1,00 (1); Phe. 1,97 (2);  
15 contenido de péptido, 73%.

#### Ejemplo 39

Producción de  $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Producción de di-Z-Dab-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.

De la misma manera que en el Ejemplo 34-e),  
20 0,80 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> se trataron con  
HBr-ácido acético y se disolvieron en 10 ml de DMF. La  
disolución se neutralizó con trietilamina. Por otro lado,  
0,50 g de di-Z- $\alpha, \gamma$ -Dab-OH y 0,26 g de HONB se disolvieron en 5 ml de tetrahidrofurano y, enfriando al mismo  
25 tiempo con hielo, se añadieron 0,30 g de DGC. La mezcla



se agitó durante 4 horas y la diciclohexilurea formada se separó por filtración.

El filtrado se añadió al anterior componente de amina, H-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se separó por destilación bajo presión reducida y se añadió agua al residuo. El polvo resultante se recuperó por filtración y se secó bien. El polvo se lavó con acetato de etilo y se precipitó de nuevo a partir de DMF-acetato de etilo.

10 Rendimiento 0,82 g (78%); punto de fusión: 184-188°C;

$[\alpha]_D^{23}$  -19,5° (c = 1,1%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para C<sub>46</sub>H<sub>55</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>.H<sub>2</sub>O :

C 57,79; H 6,01; N 16,21

Encontrado: C 57,95; H 5,91; N 16,19

15 b) Producción de α, γ-Dab-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.

En 30 ml de ácido acético se disolvieron 600 mg de Di-Z-α, γ-Dab-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 6 horas, con Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración y el disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se aplicó a una columna (1,5 cm x 13 cm) de carboximetilsephadex, y se efectuó la elución por el método del gradiente lineal, con acetato de amonio acuoso 0,1N (700 ml) y acetato de amonio acuoso 1N (700 ml). Las fracciones de 610 ml a 680 ml

25

72 APR 1975

se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento 255 mg

(46%):  $[\alpha]_D^{23} -12,5^{\circ}$  (c = 0,8%, agua).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{30}H_{44}O_5N_{10} \cdot 3C_2H_4O_2 \cdot 3H_2O$  :  
C 50,34; H 7,28; N 16,31.

5                    Encont.                    C 50,59; H 7,61; N 16,93.

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00 (1); Glu. 1,00 (1);  
Phe. 1,98 (2);  $\alpha, \gamma$ -Dab. 1,02  
(1). Contenido de péptido: 72%.

Ejemplo 40

10                    Producción de Arg-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

a) Producción de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>

Del mismo modo que en el Ejemplo 34-e),

0,80 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub> se trataron con  
HBr-ácido acético y se disolvieron en 10 ml de DMF. La  
15                    disolución se neutralizó con trietilamina. Por otro lado,  
0,39 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-OH y 0,22 g de 2,4-dinitrofenol se  
disolvieron en 5 ml de tetrahidrofurano, y, enfriando al  
mismo tiempo con hielo, se añadieron 0,25 g de DCC. La  
mezcla se agitó durante 2 horas y la dicitclohexilurea  
20                    formada se separó por filtración. El producto de filtra-  
ción se añadió al anterior componente de amina, H-Arg(NO<sub>2</sub>)-  
-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, seguido por agitación durante la noche.  
El disolvente se separó por destilación bajo presión re-  
ducida, y se añadió agua al residuo. El producto aceito  
25                    so se lavó bien con agua, y se precipitó de nuevo a partir



de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 0,90 g (89%);  
 punto de fusión: 89-92°C;  $[\alpha]_D^{23}$  -17,6° (c = 1,0%,  
 DMF).

5 Análisis elemental: Calc. para  $C_{40}H_{52}O_{11}N_{14} \cdot H_2O$  :  
 C 52,05; H 5,90; N 21,25

Encontrado: C 52,20; H 6,16; N 20,91

b) Producción de Arg-Arg-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>.

10 En 40 ml de ácido acético se disolvieron  
 700 mg de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>, y se  
 efectuó una reducción catalítica durante 9 horas, con  
 Pd como catalizador. El catalizador se separó por fil-  
 tración, y el disolvente se separó por destilación bajo  
 presión reducida. El residuo se aplicó a una columna  
 15 (3 cm x 18 cm) de carboximetilcelulosa, y se efectuó la  
 elución con acetato de amonio acuoso 0,005N (1 l) y  
 acetato de amonio acuoso 0,3N (1 l). Las fracciones  
 desde 890 ml a 1410 ml se reunieron y se liofilizaron.  
 Rendimiento 380 mg (45%);  $[\alpha]_D^{22}$  +2,4° (c = 0,5%,  
 ácido acético al 5%).

20 Análisis elemental: Calc. para  $C_{32}H_{48}O_5N_2 \cdot 3C_2H_4O_2 \cdot 3/2H_2O$  :  
 C 51,40; H 7,15; N 18,93

Encontrado: C 51,25; H 7,29; N 19,08

Análisis de aminoácidos: Arg. 2,02 (2); Gly. 1,00 (1);  
 Phe. 2,02 (2); contenido de  
 péptido, 73%.

25



Ejemplo 41

Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Producción de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt

5 A 26,3 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt se añadieron  
130 ml de HBr-ácido acético al 25%, y se añadió éter etí-  
lico, después de agitar a temperatura ambiente durante  
60 minutos. El precipitado se recuperó por filtración  
y se secó sobre hidróxido de sodio. El precipitado seco  
se disolvió después en 150 ml de DMF, y, después de en-  
10 friar con hielo, la disolución se neutralizó con trietil  
amina. Después se añadieron 23,1 g de Z- $\beta$ -Ala-NOB, y  
la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se  
separó por destilación bajo presión reducida, y el re-  
siduo se disolvió en 300 ml de acetato de etilo que con-  
15 tenía una pequeña proporción de n-butanol. La disolución  
se lavó con agua, con una disolución acuosa saturada de  
bicarbonato de sodio (100 ml x 3) y con una disolución  
acuosa saturada de cloruro de sodio (100 ml x 3), y des-  
pués se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disol-  
20 vente se separó por destilación bajo presión reducida,  
y se añadió éter etílico. El polvo resultante se recu-  
peró por filtración, y se recristalizó a partir de eta-  
nol-acetato de etilo. Rendimiento 22,9 g (75%); punto  
de fusión: 97-99°C;  $[\alpha]_D^{26,5}$  -11,2° (c = 0,9%, DMF).  
25 Análisis elemental: Calc. para C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>O<sub>8</sub>N<sub>7</sub> :



C 49,50; H 6,13; N 19,25

Encontrado: C 49,51; H 6,06; N 18,93

b) Producción de Z-β-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH

En una mezcla de 50 ml de acetona y 25 ml  
 5 de agua se disolvieron 12,1 g de Z-β-Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-  
 -OEt, y, bajo enfriamiento con hielo y cloruro de sodio,  
 se añadieron gota a gota 27,8 ml de disolución acuosa 1N  
 de hidróxido de sodio, durante un período de 30 minutos.  
 La mezcla se agitó en las mismas condiciones durante 1  
 10 hora, y durante 2 horas más a temperatura ambiente, y,  
 después de añadir 3,8 ml de ácido clorhídrico 1N, la  
 acetona se separó por destilación bajo presión reducida.  
 Al residuo se le añadieron 50 ml de agua, y la mezcla se  
 hizo ácida con ácido clorhídrico 6N, produciéndose una  
 15 sustancia aceitosa que solidificó enseguida. El pro-  
 ducto sólido así obtenido se recogió por filtración.  
 Rendimiento 10,3 g (86,0%). Punto de fusión: 101-103°C;  
 $[\alpha]_D^{26,5} -10,2^{\circ}$  (c = 1,0%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>O<sub>8</sub>N<sub>7</sub>.1/2H<sub>2</sub>O:

20 C 46,53; H 5,75; N 19,99

Encontrado: C 46,28; H 5,41; N 20,01

c) Producción de Z-Phe-Tyr-OMe

En 100 ml de tetrahidrofurano se pusieron  
 en suspensión 5,10 g de Tyr-OMe.HCl, y, después de enfriar  
 25 con hielo, la suspensión se neutralizó con 3,08 ml de



5 trietilamina. Se añadieron a la suspensión 5,99 g de  
Z-Phe-OH, 3,94 g de HONB y 4,54 g de DCC, y la mezcla  
se agitó durante la noche. La diciclohexilurea formada  
se separó por filtración, y el disolvente se eliminó por  
10 evaporación bajo presión reducida. El residuo se disol-  
vió en 200 ml de acetato de etilo. La disolución se lavó  
con una disolución acuosa saturada de bicarbonato de so-  
dio (100 ml x 3), con ácido clorhídrico 1N (100 ml x 3)  
y con agua, seguido por secado sobre sulfato de sodio  
anhidro. Después de eliminar el acetato de etilo por  
destilación bajo presión reducida, se añadió éter de  
petróleo, dando un residuo gelatinoso, que se recuperó  
por filtración y se precipitó de nuevo a partir de ace-  
tato de etilo-éter de petróleo. Rendimiento 6,00 g  
15 (63%); punto de fusión: 132-133°C;  $[\alpha]_D^{26,5} -9,9^\circ$   
(c = 1,0%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{27}H_{28}O_6N_2$  :  
C 68,05; H 5,92; N 5,88  
Encontrado: C 68,07; H 5,92; N 5,95

20 d) Producción de Z-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 40 ml de metanol saturado con amoníaco  
se disolvieron 3,0 g de Z-Phe-Tyr-OMe, y la disolución  
se guardó durante una semana en un recipiente cerrado  
herméticamente, con lo que se separaron unas agujas.  
25 Después de separar el disolvente por evaporación bajo



presión reducida, se añadió éter etílico, y los cristales resultantes se recuperaron por filtración, y se recrystalizaron a partir de etanol-agua. Rendimiento 2,61 g (90%); punto de fusión: 217-218°C;  $[\alpha]_D^{26,5}$  -28,6° (c = 1,0%, DMF).

5 Análisis elemental. Calc. para  $C_{26}H_{27}O_5N_3$  : C 67,66; H 5,90; N 9,11

Encontrado: C 67,45; H 5,88; N 9,05

e) Producción de Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

10 A 1,15 g de Z-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> se añadió una pequeña proporción de anisol, y después se añadieron 11 ml de HBr-ácido acético al 25%. Después de agitar a temperatura ambiente durante 40 minutos, se añadió éter etílico. El precipitado resultante se recuperó por filtración y se  
15 secó sobre hidróxido de sodio. Por otro lado, 0,67 g de Z-Phe-OH y 0,45 g de HONB se disolvieron en 5 ml de tetra hidrofurano, y, enfriando al mismo tiempo con hielo, se añadieron 0,52 g de DCC. La mezcla se agitó durante 4 horas, y la dicitclohexilurea formada se separó por filtra-  
20 ción. El anterior componente de amina, H-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, se disolvió en 10 ml de DMF, y la disolución se neutralizó con trietilamina. A esta disolución se le añadió la anterior disolución de éster activo, y la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se separó por destilación  
25 bajo presión reducida y se añadió agua. Los cristales re-



sultantes se recuperaron por filtración y se recristaliza  
ron a partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 1,01  
g (74%). Punto de fusión: 218-221°C (con descomp.);

$[\alpha]_D^{26,5} -27,7^\circ$  (c = 1,0%, DMF).

5 Análisis elemental: Calc. para  $C_{35}H_{36}O_6N_4$  :

C 69,06; H 5,96; N 9,21

Encontrado: C 69,01; H 6,02; N 9,23

f) Producción de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En una mezcla de 30 ml de metanol y 20 ml  
10 de DMF se pusieron en suspensión 0,91 g de Z-Phe-Phe-Tyr-  
-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 7 ho-  
ras. El metanol se separó por destilación bajo presión  
reducida. Por otro lado, 0,72 g de Z- $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-  
-Gly-OH y 0,32 g de HONB se disolvieron en 5 ml de DMF,  
15 y, enfriando al mismo tiempo con hielo, se añadieron  
0,37 g de DCC. La mezcla se agitó durante 6 horas, y  
la dicitclohexilurea formada se separó por filtración.  
El producto de filtración se añadió al anterior compo-  
nente de amina, H-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y después se agitó  
20 durante la noche. El disolvente se separó por evapo-  
ración bajo presión reducida, dando un sólido que se  
trituró con agua. El polvo resultante se recuperó por  
filtración y se precipitó de nuevo a partir de DMF-ace-  
tato de etilo. Producción, 0,88 g (62%); punto de fu-  
sión: 174-177°C;  $[\alpha]_D^{26,5} -15,0^\circ$  (c = 1,0%, DMF).  
25



Análisis elemental: Calc. para  $C_{44}H_{55}O_{11}N_{11} \cdot H_2O$  :  
C 57,79; H 6,01; N 16,12

Encontrado: C 57,54; H 6,18; N 16,21

g) Producción de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

5 En 30 ml. de ácido acético se disolvieron  
740 mg de  $\alpha$ - $\beta$ -Ala-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se  
efectuó una reducción catalítica durante 7 horas con Pd  
como catalizador. El catalizador se separó por filtra-  
ción y el disolvente se separó por destilación bajo pre-  
10 sión reducida. El residuo se aplicó a una columna (1,6 cm  
x 15 cm) de carboximetilsephadex, y se efectuó la elución  
por el método del gradiente lineal, con acetato de amonio  
acuoso 0,005N (700 ml) y acetato de amonio acuoso 1N (700  
ml.). Las fracciones desde 580 ml a 790 ml se reunieron  
15 y se liofilizaron. Producción, 540 mg (75%);  $[\alpha]_D^{26}$   
-20,0° (c = 0,5%, agua).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{38}H_{50}O_7N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 3H_2O$  :  
C 54,06; H 6,91; N 15,01

Encontrado: C 54,20; H 6,50; N 14,99.

20 Análisis de aminoácidos: Arg. 0,95 (1); Gly. 1,05 (1);  
Tyr. 1,00 (1); Phe. 2,00 (2);  
contenido de péptido, 74%.

h) Producción de dicitrato de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-  
-NH<sub>2</sub>

25 El acetato, diacetato de  $\beta$ -Ala-Arg-Gly-Phe-

22 ABR 1975

-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> trihidratado, (9,33 g) se disolvió en 20 ml de agua y a esto se añadieron 2,2 g de ácido cítrico monohidratado con agitación. El precipitado cristalino formado se recogió por filtración y se lavó con un pequeño volumen de agua fría dando 10,4 g del dicitrato correspondiente.

$[\alpha]_D^{23} -19,6^\circ$  (c = 1,0 en agua).

Análisis elemental. Calculado para C<sub>38</sub>H<sub>50</sub>O<sub>7</sub>N<sub>10</sub> · 2 C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> :

C, 52,54; H, 5,82; N, 12,25

10 Encontrado: C, 52,28; H, 5,87; N, 12,46

#### Ejemplo 42

Producción de  $\gamma$ -Abu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Producción de Z- $\gamma$ -Abu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt

15 A 4,38 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt se le añadieron 40 ml de HBr-ácido acético al 25%, y, después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió éter etílico. El precipitado resultante se recuperó por filtración y se secó sobre hidróxido de sodio.

20 Después se disolvió en 30 ml de DMF, y, tras enfriar con hielo, la disolución se neutralizó con trietilamina. A esta disolución se le añadieron 4,16 g de Z- $\gamma$ -Abu-ONB y la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se extrajo por destilación bajo presión reducida, y se añadió agua al residuo. El agua se separó por  
25 decantación. Se añadió éter etílico al residuo, con lo que este último solidificó. Después se recuperó por fil-

4-4-75



tración, y se precipitó de nuevo a partir de acetonitrilo. Rendimiento 2,5 g (48%); punto de fusión: 60-62°C,  $[\alpha]_D^{21}$  -11,1° (c = 1,0%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{22}H_{33}O_8N_7$  :

5 C 50,47; H 6,35; N 18,73

Encontrado: C 50,12; H 6,51; N 18,73

b) Producción de Z-gamma-Abu-Arg (NO<sub>2</sub>)-Gly-OH

En 20 ml de acetona se disolvieron 2,0 g de Z-γ-Abu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt, y enfriando con hielo, se añadieron 5,7 ml de disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 N. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la adición de 6 ml de ácido clorhídrico 1 N, la acetona se separó por destilación bajo presión reducida. Los cristales resultantes se recuperaron por filtración y se recrystalizaron a partir de etanol-agua. Rendimiento 1,86 g (98%); punto de fusión: 113-115°C.  $[\alpha]_D^{21}$  -20,0° (c = 1,1%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{20}H_{29}O_8N_7 \cdot H_2O$ :

C 46,78; H 6,09; N 19,10

20 Encontrado: C 57,12; H 5,90; N 19,23

c) Producción de Z-γ-Abu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

A 1,34 g de Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> se añadió una pequeña cantidad de anisol, seguido por la adición de 13 ml de HBr-ácido acético al 25%.

25 Después de agitar a temperatura ambiente du-

22 APR 1975

rante 45 minutos, se añadió éter etílico, y el precipitado resultante se recuperó por filtración y se secó sobre hidróxido de sodio. Por otro lado, 0,99 g de Z- $\gamma$ -Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH y 0,43 g de HONB se disolvieron en 5 ml de DMF, y, con enfriamiento con hielo, se añadieron 0,50 g de DCC. La mezcla se agitó durante 6 horas, y la dicitelo hexilurea se separó por filtración. El anterior componente de amina, (H-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>), se disolvió en 10 ml de DMF, y la disolución se neutralizó con trietilamina. A esta disolución se le añadió la anterior disolución de éster activo, y la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadió agua. El polvo resultante se recuperó por filtración, se lavó con acetato de etilo, y se precipitó de nuevo a partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 1,12 g (58%); punto de fusión 139,5-141°C;

$[\alpha]_D^{21}$  -13,2° (c = 13,2° (c = 1,4%, DMF)).

Análisis elemental. Calc. para C<sub>47</sub>H<sub>57</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>·H<sub>2</sub>O :

C 58,19; H 6,13; N 15,89

Encontrado: C 57,76; H 6,43; N 15,91

d) Producción de  $\gamma$ -Abu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 30 ml de ácido acético se disolvieron 800 mg de Z- $\gamma$ -Abu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 14 horas, con Pd como catalizador. El catalizador se separó por



filtración, y el disolvente se eliminó por destilación bajo presión reducida. El residuo se aplicó a una columna (1,5 x 10 cm) de carboximetil-sephadex, y se efectuó la elución por el método del gradiente, con acetato de amonio acuoso 0,1N (700 ml) y con acetato de amonio acuoso 1N (700 ml). Las fracciones desde 410 ml a 600 ml se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento 412 mg (52%);  $\overline{[\alpha]}_D^{22} -18,1^\circ$  (c = 0,5%, agua).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{39}H_{52}O_7N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 4H_2O$  :  
C 54,02; H 7,10; N 14,52  
Encontrado: C 54,08; H 7,07; N 14,60.

Análisis de aminoácidos: Arg. 0,96 (1); Gly. 1,00 (1); Tyr. 0,97 (1); Phe. 2,10 (2); contenido de péptido, 84%

#### Ejemplo 43

Producción de  $\xi$ -Acap-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Producción de Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt

A 2,41 g de Z-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt se añadieron 12 ml de HBr-ácido acético al 25%, y, después de agitar a temperatura ambiente durante 40 minutos, se añadió éter etílico. El precipitado resultante se recuperó por filtración y se secó sobre hidróxido de sodio.

Por otro lado, 133 g de Z- $\xi$ -Acap-OH

22 FEB 1975

y 0,99 g de HONB se disolvieron en 5 ml de tetrahidrofurano, y, enfriando al mismo tiempo con hielo, se añadieron 1,14 g de DCC.

5 La mezcla se agitó durante 4 horas y la diciclohexilurea formada se separó por filtración. El anterior componente de amina se disolvió en 10 ml de DMF, y, después de neutralizar la disolución con trietilamina, se añadió la anterior disolución de éster activo. La mezcla se agitó durante la noche y el  
10 disolvente se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se disolvió en 50 ml de acetato de etilo y la disolución se lavó con agua, con una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (50 ml x 2) y con agua, seguido por secado sobre carbonato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación  
15 bajo presión reducida, y se añadió éter de petróleo. Los cristales resultantes se recrystalizaron a partir de agua-etanol-acetato de etilo. Rendimiento 2,1 g (78%); punto de fusión: 85-87°C;  $[\alpha]_D^{24}$  -11,9° (c = 1,0%, DMF).

20 Análisis elemental: Calc. para  $C_{24}H_{37}O_8N_7$  :

C 52,26; H 6,76; N 17,78

Encontrado: C 52,43; H 6,64; N 17,76

b) Producción de Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH

25 En 10 ml de acetona se disolvieron

4-4-75

92 APR 1973

1,8 g de Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt, y, enfriando al mismo tiempo con hielo, se añadieron 2,9 ml de disolución acuosa 2N de hidróxido de sodio. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la adición de 2,5 ml de ácido clorhídrico 1N, la acetona se separó por destilación bajo presión reducida. Al residuo se le añadieron 10 ml de agua, y las sustancias insolubles se separaron por filtración. El producto de filtración se hizo ácido con ácido clorhídrico 1N, con lo que se separaron unos cristales. Estos cristales se recuperaron por filtración. Rendimiento 1,59 g (93%); punto de fusión 97,5-99°C;  $\bar{M}_w$   $\frac{24}{D}$  -10,7 $\mu$  (c = 1,0%, DMF).

15 Análisis elemental: Calc. para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>O<sub>8</sub>N<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O :

C 48,79; H 6,52; N 18,10

Encontrado: C 48,50; H 6,28; N 18,23.

c) Producción de Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

20 A 1,22 g de Z-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub> se añadió una pequeña cantidad de anisol, y después se añadieron 10 ml de HBr-ácido acético al 25%. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 40 minutos y se añadió éter etílico. El precipitado se recuperó por filtración y se secó sobre hidróxido de sodio. Por otro lado, 1,05 g de Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH y 0,36 g de

22 ABR 1975

HONB se disolvieron en 10 ml de DMF, y, bajo enfriamiento con agua, se añadieron 0,42 g de DCC. La mezcla se agitó durante 6 horas, y la diciclohexilurea subproducto se separó por filtración. El anterior componente de amina se disolvió en 10 ml de DMF, y la disolución se neutralizó con trietilamina.

A esta disolución se le añadió la anterior disolución de éster activo, y la mezcla se agitó durante la noche. El disolvente se separó por destilación bajo presión reducida, y se añadió agua. El polvo resultante se recuperó por filtración, se lavó con acetato de etilo y se precipitó de nuevo a partir de DMF-acetato de etilo. Rendimiento 1,01 g (57%); punto de fusión: 149-151°C;  $[\alpha]_D^{26} -12,9^{\circ}$  (c = 1,1%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{57}H_{67}O_{13}N_{11} \cdot 1/2 H_2O$  :  
C 59,50; H 6,32; N 15,58

Encontrado: C 59,63; H 6,43; N 15,03

d) Producción de  $\xi$ -Acap-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 40 ml de ácido acético se disolvieron 700 mg de Z- $\xi$ -Acap-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 14 horas, con Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración, y el disolvente se eliminó por destilación bajo presión reducida. El residuo se aplicó a una columna de carboximiltilsephadex (1,8 x 12 cm) y se efectuó la elución por el



método del gradiente lineal, usando acetato de amonio acuoso 0,1N (700 ml) y acetato de amonio acuoso 1N (700 ml). Las fracciones de 430 a 550 ml. se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento 430 mg (62%);  $[\alpha]_D^{26} -13,2^\circ$  (c = 0,5%, agua).

5

Análisis elemental: Calc. para  $C_{41}H_{56}N_7O_{10} \cdot 2C_2H_4O_2 \cdot 3H_2O$  :  
 C 55,43; H 7,24; N 14,37

Encontrado: C 55,48; H 7,39; N 14,47.

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00 (1); Gly. 1,00 (1); Tyr. 1,00 (1); Phe. 2,07 (2).

10

Contenido de péptido: 84%.

Ejemplo 44

Producción de Lys-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Producción de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt.

15

Usando 2,07 g de di-Z-Lys-OH, se siguió exactamente el mismo procedimiento que en el Ejemplo 43-a), para obtener el compuesto deseado en forma de un gel. La reprecipitación a partir de agua-etanol-acetato de etilo dió 2,57 g (73%); punto de fusión: 161-162°C;  $[\alpha]_D^{24} -11,9^\circ$  (c = 1,0%, DMF).

20

Análisis elemental: Calc. para  $C_{32}H_{44}O_{10}N_8$  :  
 C 54,85; H 6,33; N 15,99.

Encontrado: C 54,45; H 6,05; N 15,99

b) Producción de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH

25

En 10 ml. de acetona se disolvieron 2,0 g de

SECRET  
27 APR 1975

di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt, y, enfriando al mismo tiempo con hielo, se añadieron 2,1 ml de disolución acuosa 2N de hidróxido de sodio. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la adición de 1,4 ml de ácido clorhídrico 1N, la acetona se separó por destilación bajo presión reducida. El residuo se diluyó con 10 ml de agua, y los materiales insolubles se separaron por filtración. La disolución se hizo ácida después con ácido clorhídrico 1N, y el precipitado gelatinoso resultante se recuperó por filtración. Rendimiento 1,78 g (93%); punto de fusión: 131-132,5°C;  $[\alpha]_D^{24}$  -10,5° (c = 1,0%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para C<sub>30</sub>H<sub>40</sub>O<sub>10</sub>N<sub>8</sub>·3/2H<sub>2</sub>O :

C 51,49; H 6,20; N 16,02

Encontrado: C 51,43; H 5,92; N 16,23.

c) Producción de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

Usando 1,21 g de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH, se siguió exactamente el mismo procedimiento que en el Ejemplo 43-c), para obtener el compuesto deseado en forma de gel. Rendimiento 1,21 g (58%); punto de fusión: 199-203°C;  $[\alpha]_D^{24}$  -13,3° (c = 1,0%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para C<sub>57</sub>H<sub>68</sub>O<sub>13</sub>N<sub>12</sub>·2H<sub>2</sub>O :

C 58,75; H 6,23; N 14,42

Encontrado: C 58,70; H 6,26; N 14,72

d) Producción de Lys-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 30 ml de ácido acético se disolvió 1,00 g



de di-Z-Lys-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 20 horas, con Pd como catalizador. El catalizador se separó por filtración, y el disolvente se eliminó por destilación bajo presión reducida. El residuo se aplicó a una columna (1,8 cm x 10 cm) de carboximetilsephadex. Se efectuó la elución por el método del gradiente lineal, a partir de acetato de amonio acuoso 0,1N (500 ml) y hasta acetato de amonio acuoso 1N (500 ml) y las fracciones de 650 ml a 890 ml se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento 468 mg (50%);  $[\alpha]_D^{26} -10,6^{\circ}$  (c = 0,5%, agua).

Análisis elemental: Calc. para C<sub>41</sub>H<sub>57</sub>O<sub>7</sub>N<sub>11</sub>·3C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O :

C 52,84; H 7,27; N 14,43

Encontrado: C 52,70; H 7,31; N 14,72

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00 (1); Lys. 0,94 (1); Gly. 1,00 (1); Tyr. 1,00 (1); Phe. 2,06 (2); contenido de péptido: 82%.

#### Ejemplo 45

Producción de  $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

a) Producción de di-Z- $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt.

En 40 ml de éter etílico se pusieron en suspensión 2,84 g de di-Z-alfa,gamma-Dab-OH.DCHA ("DCHA" es una abreviatura de diciclohexilamina) y la suspensión se agitó con ácido sulfúrico 0,5N. La capa de éter se



lavó con agua y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El disolvente se separó por destilación, y se siguió exactamente el mismo procedimiento que en el Ejemplo 43-a) para obtener el compuesto deseado en forma de gel. Se precipitó de nuevo a partir de agua-etanol-acetato de etilo. Rendimiento 2,36 g (70%); punto de fusión: 153-156°C;  $[\alpha]_D^{24} -9,4^\circ$  (c = 1,0%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para  $C_{30}H_{40}O_{10}N_8$  :

C 53,56; H 5,99; N 16,66

10 Encontrado: C 53,26; H 5,84; N 16,24

b) Producción de di-Z- $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OH

En 10 ml de acetona se disolvieron 2,0 g de di-Z- $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-OEt, y, con enfriamiento con hielo, se añadieron gota a gota 2,97 ml de hidróxido de sodio acuoso 2N. La mezcla se agitó en las mismas condiciones durante 1 hora, y se añadieron 3 ml de ácido clorhídrico 1N. La acetona se separó por destilación bajo presión reducida y se añadieron 10 ml de agua. Los materiales insolubles se separaron por filtración, y el filtrado se hizo ácido con ácido clorhídrico 1N. El precipitado gelatinoso resultante se recuperó por filtración. Rendimiento 1,67 g (90%); punto de fusión: 112-113°C;  $[\alpha]_D^{26} -8,3^\circ$  (c = 1,1%, DMF).

25 Análisis elemental: calc. para  $C_{28}H_{36}O_{10}N_8 \cdot H_2O$  :

C 50,55; H 5,76; N 16,89

Encontrado: C 50,53; H 5,59; N 17,19



22 ABR 1975

c) Producción de di-Z- $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

Usando 1,12 g. de di-Z- $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-

OH, se siguió exactamente el mismo procedimiento que en el Ejemplo 43-c) para obtener el compuesto deseado en forma de gel. Rendimiento 1,02 g (51%); punto de fusión: 191-195°C;  $[\alpha]_D^{26}$  -14,0° (c = 0,9%, DMF).

Análisis elemental: Calc. para C<sub>55</sub>H<sub>64</sub>O<sub>13</sub>N<sub>12</sub>·H<sub>2</sub>O :

C 59,02; H 5,95; N 15,02

Encontrado: C 59,13; H 6,14; N 15,46.

d) Producción de  $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>

En 30 ml. de ácido acético se disolvieron

600 mg. de di-Z- $\alpha, \gamma$ -Dab-Arg(NO<sub>2</sub>)-Gly-Phe-Phe-Tyr-NH<sub>2</sub>, y se efectuó una reducción catalítica durante 12 horas, con Pd

como catalizador. El catalizador se separó por filtración y el disolvente se eliminó por evaporación bajo presión

reducida. El residuo se aplicó a una columna (1,8 cm x 10 cm) de carboximetilsephadex, y se efectuó la elución

por el método de gradiente lineal, desde acetato de amonio acuoso 0,1N (500 ml) hasta acetato de amonio acuoso

1N (500 ml). Las fracciones desde 490 ml a 620 ml se reunieron y se liofilizaron. Rendimiento 241 mg (43%);

$[\alpha]_D^{26}$  -17,9° (c = 0,6%, agua).

Análisis elemental: Calc. para C<sub>39</sub>H<sub>53</sub>O<sub>7</sub>N<sub>11</sub>·3C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O :

C 51,96; H 7,08; N 14,82

22 APR 1968

Encontrado: C 52,12; H 6,99; N 15,31.

Análisis de aminoácidos: Arg. 1,00 (1); Dab. 1,04 (1);

Gly. 1,09 (1); Tyr. 1,02 (1);

Phe. 2,13 (2); contenido de

péptido, 79%.

5

Lista de Ejemplos  
R<sub>1</sub>-Arg-R<sub>2</sub>-Phe-Phe-R<sub>3</sub>

10

15

20

25

Ej.	R <sub>1</sub>	Nº de C	R <sub>2</sub>	Nº de C	R <sub>3</sub>
1	H	-	Pro	5	Tyr-NH <sub>2</sub>
2	Gly	2	Pro	5	Tyr-NH <sub>2</sub>
3	γ-Abu	4	Pro	5	Tyr-NH <sub>2</sub>
4	ξ-Acap	6	Pro	5	Tyr-NH <sub>2</sub>
5	Lys	*6	Pro	5	Tyr-NH <sub>2</sub>
6	α,γ-Dab	*4	Pro	5	Tyr-NH <sub>2</sub>
7	β-Ala	3	Pro	5	Tyr-NH <sub>2</sub>
8	β-Ala	3	Pro	5	NH <sub>2</sub>
9	β-Ala	3	β-Ala	3	Tyr-NH <sub>2</sub>
10	Ala	3	β-Ala	3	Tyr-NH <sub>2</sub>
11	β-Ala	3	Sar	3	Tyr-NH <sub>2</sub>
12	Leu	6	Pro	5	Tyr-NH <sub>2</sub>

22 APR 1975

(cont.)

Ej.	R <sub>1</sub>	Nº de C	R <sub>2</sub>	Nº de C	R <sub>3</sub>	
5	13	$\beta$ -Ala	3	Phe	9	Tyr-NH <sub>2</sub>
	14	$\beta$ -Ala	3	Leu	6	Tyr-Gly-NH <sub>2</sub>
	15	$\beta$ -Ala	3	Ser	3	Tyr-Gly-NH <sub>2</sub>
10	16	$\beta$ -Ala	3	Pro	5	Tyr-Thr-Pro- -Lys-Ala
	17	$\beta$ -Ala	3	Gly	2	Tyr-Leu
	18	$\beta$ -Ala	3	Gly	2	Tyr-Ala-NH <sub>2</sub>
1.5	19	$\beta$ -Ala	3	Gly	2	Tyr-Thr-Pro
	20	$\xi$ -Acap	6	Gly	2	Tyr-Thr-Pro
	21	Lys	*6	Gly	2	Tyr-Thr-Pro-
20	22	$\beta$ -Ala	3	Gly	2	Tyr-Thr-Pro- -Lys-Ala
	23	Gly	2	Gly	2	Tyr-Thr-Pro- Lys-Ala
25						

4-4-75

(cont.)

22 ABR



Ej.	R <sub>1</sub>	Nº de C	R <sub>2</sub>	Nº de C	R <sub>3</sub>
24	Leu	6	Gly	2	Tyr-Gly-NH <sub>2</sub>
5 25	$\beta$ -Ala	3	Gly	2	Tyr-Ala-Gly-NH <sub>2</sub>
26	$\alpha, \gamma$ -Dab *4		Gly	2	Tyr-Ala-Gly-NH <sub>2</sub>
27	Gly	2	Gly	2	NH <sub>2</sub>
10 28	D-Ala	3	Gly	2	NH <sub>2</sub>
29	Phe	9	Gly	2	NH <sub>2</sub>
30	Leu	6	Gly	2	Tyr-NH <sub>2</sub>
15 31	$\alpha$ -Abu	4	Gly	2	Tyr-NH <sub>2</sub>
32	Nle	6	Gly	2	Tyr-NH <sub>2</sub>
33	Val	5	Gly	2	Tyr-NH <sub>2</sub>
20 34	$\beta$ -Ala	3	Gly	2	NH <sub>2</sub>
35	$\gamma$ -Abu	4	Gly	2	NH <sub>2</sub>
25 36	$\delta$ -Aval	5	Gly	2	NH <sub>2</sub>

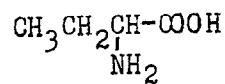
(cont.)



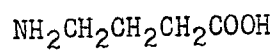
Ej.	R <sub>1</sub>	Nº de C	R <sub>2</sub>	Nº de C	R <sub>3</sub>
5	ξ-Acap	6	Gly	2	NH <sub>2</sub>
	Lys	*6	Gly	2	NH <sub>2</sub>
	α, √-Dab *4		Gly	2	NH <sub>2</sub>
10	Arg	*6	Gly	2	NH <sub>2</sub>
	β-Ala	3	Gly	2	Tyr-NH <sub>2</sub>
	√-Abu	4	Gly	2	Tyr-NH <sub>2</sub>
15	ξ-Acap	6	Gly	2	Tyr-NH <sub>2</sub>
	Lys	*6	Gly	2	Tyr-NH <sub>2</sub>
	α, √-Dab *4		Gly	2	Tyr-NH <sub>2</sub>

20 \* Aminoácido básico

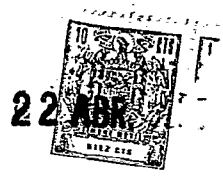
α-Abu (ácido α-aminobutírico)



25 √-Abu (ácido √-aminobutírico)



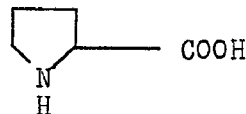
4-4-75



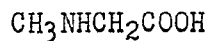
	<u><math>\xi</math>-Acap (ácido <math>\xi</math>-aminocaproico)</u>	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$
	<u>Ala (alanina)</u>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
	<u><math>\beta</math>-Ala (<math>\beta</math>-alanina)</u>	$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
5	<u>Arg (arginina)</u>	$\begin{array}{c} \text{HN}=\text{C}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3\text{CH}-\text{COOH} \\   \qquad \qquad   \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$
	<u><math>\delta</math>-Aval (ácido <math>\delta</math>-aminovalérico)</u>	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
	<u><math>\alpha, \gamma</math>-Dab (ácido <math>\alpha, \gamma</math>-diaminobutírico)</u>	$\begin{array}{c} \text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$
10	<u>Acido <math>\alpha, \beta</math>-diaminopropiónico</u>	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \qquad   \\ \text{NH}_2 \text{ NH}_2 \end{array}$
	<u>Gly (glicina)</u>	$\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
	<u>His (histidina)</u>	$\begin{array}{c} \text{N} \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{NH} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2$
15	<u>Leu (Leucina)</u>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CHCH}_2\text{CH}-\text{COOH} \\ / \qquad   \\ \text{CH}_3 \qquad \text{NH}_2 \end{array}$
	<u>Lys (Lisina)</u>	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$
20	<u>Nle (Norleucina)</u>	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$
	<u>Phe (Fenilalanina)</u>	$\text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2\text{CH}-\text{COOH}$   $\text{NH}_2$
25		

22 ABR 1975

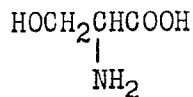
5  
Pro (Prolina)



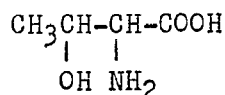
Sar (Sarcosina)



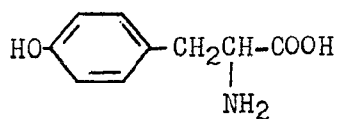
Ser (Serina)



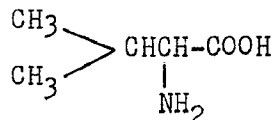
Thr (Treonina)



Tyr (Tirosina)



10  
Val (Valina)



15 En las reivindicaciones el término "aminoácidos" significa cada uno de los compuestos isómeros ópticos y racémicos, a menos que se especifique otra cosa.

20 Esta solicitud que corresponde a las presentadas en Japón, los días 26 de Marzo de 1974, bajo el nº 34161/74 y 24 de Enero de 1975, bajo el nº 10878/75, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

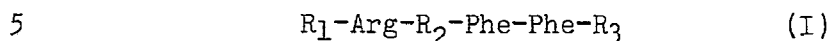
#### REIVINDICACIONES

25 Los puntos de invención propia y nueva, que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Paten-

22 APR 1975

te de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

1ª.- Un método para producir nuevos polipéptidos de la fórmula



donde  $R_1$  es hidrógeno o un resto de aminoácido básico o neutro,  $R_2$  es un resto de aminoácido neutro, y  $R_3$  es  $\text{NH}_2$ , Tyr- $\text{NH}_2$ , un resto de péptido de tirosilo que comprende de  
10 1 a 5 restos de aminoácido, o un resto de una amida del péptido de tirosilo, con la condición de que si  $R_1$  es hidrógeno,  $R_2$  es Pro, que comprende condensar un aminoácido correspondiente a  $R_1$  ó arginina si  $R_1$  es hidrógeno, o un  
15 fragmento de péptido del polipéptido (I) que tiene el resto  $R_1$  de aminoácido o el grupo arginilo cuando  $R_1$  es hidrógeno, en su aminoácido terminal N, con el fragmento restante del polipéptido (I), y cada uno de los materiales de  
20 partida puede protegerse en su grupo amino o carboxilo que no ha de estar implicado en la condensación considerada, y puede activarse en su grupo amino o carboxilo que está implicado en la condensación considerada, y eliminar del producto resultante los grupos protectores, si los hay.

4-4-75

- 120 -

7/5



22 ARR. 1975

2a.- UN METODO PARA PRODUCIR NUEVOS POLI  
PEPTIDOS.

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

5 Esta Memoria consta de ciento veintiuna ho-  
jas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,  
P.A.

22 ABK. 1975

Alberto de Eizasu  
Per Poder.  
*Alberto de Eizasu*

4-1-75

fb.

*75*