

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



19	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	447686		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			- 7 MARZO 1976 -		

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
***	***	***
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D//A61K	***
54 TITULO DE LA INVENCION		
"Procedimiento para la preparaci3n de trip3ptidos derivados de la L-prolina"		
71 SOLICITANTE (S)		
PRODUCTOS FRUMTOST S.A.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Suiza, 9 - BARCELONA		
72 INVENTOR (ES)		
D. Arturo Blad3 Font y D. Jos3 Mar3a Torres Esteban		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
M. Curell Su3ol		

R-3278-6

BAD ORIGINAL

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años

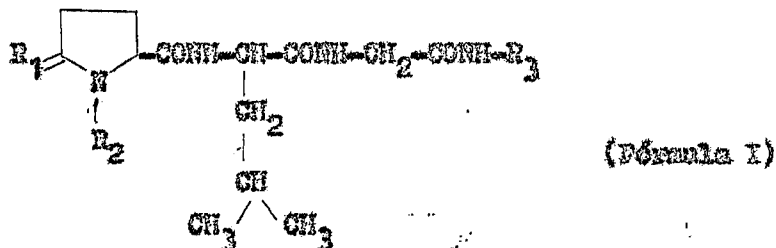
solicitada en España a favor de PRODUCTOS FINEST S.A., de nacionalidad española, domiciliada en Suiza, 9, BARCELONA, por "Procedimiento para la preparación de tripéptidos derivados de la L-prolina" - - - - -

5.

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la preparación de tripéptidos derivados de la L-prolina de fórmula general: - - - - -

10.



15.

donde R<sub>1</sub> representa 2 átomos de hidrógeno o uno de oxígeno, R<sub>2</sub> representa un átomo de hidrógeno o un grupo acilo de 1 a 8 átomos de carbono, y R<sub>3</sub> representa un átomo de hidrógeno o un radical alcohilo de 1 a 4 átomos de carbono. En estos tripéptidos definidos por la fórmula general I, el segundo resto

aminoácido corresponde a la L-leucina y el tercero a la glicina. - - - - -

5. Cuando  $R_1 = H_2$ ,  $R_2 = H$  y  $R_3 = H$ , la fórmula I representa a la L-prolil-L-leucil-glicinamida, identificada recientemente como uno de los factores hipotalámicos que inhiben la hormona pituitaria estimulante de los melanocitos. Su designación abreviada es la de MIF-I ("Melanocyte-stimulating-hormone-inhibiting factor-I") o MSH-I ("Melanocyte-stimulating hormone-release inhibiting hormone-I") [Nair, R.H.G. y col., Biochemical and Biophysical Research Communications, 43, 1376 (1971); Kastin, A.J. y col., Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 137, 1437 (1971)]. - - - -

10. Ultísimamente el MIF-I ha adquirido importancia en terapéutica por su posible utilización como agente antiparkinsoniano y como agente antidepresivo. En efecto, en la prueba de potenciación de la respuesta a la L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) se ha mostrado más eficaz que los antidepresivos tricíclicos [Plotnikoff N.P. y col., Life Sciences, 10, 1279 (1971)] y, en otro modelo animal de depresión, el MIF-I contrarresta los efectos sedantes de la decerpídina en ratones y monos [Plotnikoff N.P. y col., Neuroendocrinology, 11, 67 (1973)]. Este efecto antidepresivo ha sido confirmado en el hombre utilizando dosis orales de 60 mg diarios [Thrensing R.H. y Kastin A. J., Archives of General Psychiatry, 30, 63 (1974)]. - - -

25. En cuanto a su acción como antiparkinsoniano se ha

- comprobado, por una parte, que en animales de laboratorio antagoniza el temblor inducido por la oxetremorina [Plotnikoff H.P. y col., Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 140, 811 (1972) 7]. Por vía oral alivia en el hombre las disquinesias inducidas por la L-DOPA empleada en el tratamiento del parkinsonismo y, por sí solo, el producto tiene un efecto beneficioso sobre la enfermedad [Kestin, A.J. y Barbeau, A., Canadian Medical Association Journal, 107, 1079 (1972) 7]. Esta acción antiparkinsoniana ha sido observada también cuando el NIF-I es administrado por vía parenteral [Chase, T.N. y col., Archives of Neurology, 31, 55 (1974); Fischer P. y col. European Neurology, 12, 360 (1974) 7]. Los trabajos anteriores confirman el gran interés que presenta actualmente el NIF-I en terapéutica humana. - - - - -
15. Cuando en la fórmula I,  $R_1 = O$ ,  $R_2 = H$  y  $R_3 = H$ , el producto así definido representa la L-piroglutamil-L-leucil-glicinamida ó 5-oxo-L-prolil-L-leucil-glicinamida, un análogo del NIF cuyo interés radica en su potente acción antioxetremorina. La prueba de la oxetremorina en animales de laboratorio representa un modelo muy sencillo y reproducible de la enfermedad de Parkinson, puesto que las drogas utilizadas clínicamente contra el parkinsonismo inhiben eficazmente el temblor inducido por la oxetremorina [Everett, G.E. y col., Federation Proceedings of the American Society for Experimental Biology, 30, 677 (1971) 7]. En esta prueba la L-piroglutamil-L-leucil-
- 20.
- 25.

-glicinamida es aproximadamente 2 veces más potente que el propio EIP-I Contonson S. y col., FEBS Letters 44, 101 (1974) 7. - - - - -

5.

Dada por consiguiente la potencial importancia terapéutica de los tri péptidos representados por la fórmula I, resulta de gran interés el desarrollo de procedimientos de preparación de dichos productos adaptables a escala industrial o de planta piloto. - - - - -

10.

Enche antes de que se identificara la L-prolil-L-leu cil-glicinamida como un factor hipotalámico se habían descrito ya varias síntesis del propio tri péptido o de sus derivados, porque dicho péptido constituye la porción terminal de la oxitocina, es decir, la hormona de la pituitaria estimulante de la lactación y de la contracción del útero Ressler C.

15.

y du Vigneau V., Journal of the American Chemical Society, 76, 3107 (1954); Boissonas R.A. y col., Helvetica Chimica Acta, 38, 1491 (1955); Zaoral M. y Rudinger J., Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 20, 1183, (1955); Bodansky E. y du Vigneau V., Journal of the American Chemical Society, 81, 5688 (1959); Cash, W.D., Journal of Organic Chemistry, 26, 2136 (1961) 7. - - - - -

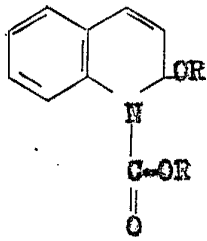
20.

Estas son síntesis peptídicas clásicas realizadas en medio líquido, aunque últimamente han aparecido otras en fase sólida Mizoguchi, T. y col., Chemical Pharmaceutical

(Tokyo), 18, 1465 (1970); Pietta P. y Brenna G., Journal of Organic Chemistry, 40, 2995 (1975) 7. - - - - -

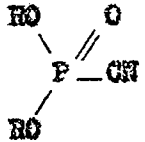
5. Hemos descrito en las solicitudes de patentes españolas nos. 407.222 y 432.826 el interés que presenta en las síntesis peptídicas la utilización de nuevos reactivos de condensación como son las 1-alkiloxycarbonil-2-alkiloxi-1,2-dihidroquinolinas de fórmula general II y los cianuros de dialcohol (o diarilfosforilo) de fórmula general III, - - -

10.



(Fórmula II)

15.



(Fórmula III)

20.

donde R representa por lo general un grupo alcohol de bajo peso molecular, que permiten, en particular, la utilización directa (es decir, sin protección previa de su grupo nitrogenado) del ácido L-piroglutámico ó 5-oxo-L-prolina, aminocido que forma parte de péptidos fisiológicamente activos existentes en el hipotálamo, como son la hormona liberadora de la

tirotrófina (TRH) y la hormona liberadora de la hormona luteotrófica o luteinizante (LH-RH). - - - - -

5.

Por otra parte, los reactivos señalados se caracterizan por el hecho, sumamente importante en síntesis peptídica, de evitar de manera notable la racemización de los aminoácidos que intervienen en la condensación. - - - - -

10.

Otro reactivo mucho más conocido que permite la condensación directa del ácido L-pirrolidónico con aminoderivados es la dicitclohexilcarbodiimida, cuya aplicación a la síntesis en fase líquida de los tripéptidos de la fórmula general I, al igual que la de los reactivos de fórmula II y III, hemos encontrado que resultan altamente ventajosas, sin que se hallen descritas en las síntesis publicadas hasta ahora. - - - - -

15.

Por otra parte, hemos encontrado de manera inesperada que en la síntesis de los compuestos de fórmula I resulta particularmente conveniente la protección del grupo nitrogenado de la L-prolina y de la L-leucina por formilación. Las condensaciones peptídicas en las que intervienen los N-formilaminocidos correspondientes y los agentes de condensación antes señalados se llevan a cabo en medio líquido apéptico sin racemización apreciable. En particular se obtienen buenos resultados utilizando como disolventes el cloruro de metileno, el tetrahidrofurano o la dimetilformamida, y resulta ventajoso trabajar a bajas temperaturas comprendidas entre los -10°

20.

25.

y los 10° C. - - - - -

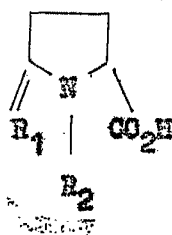
5.

Para la subsiguiente desformilación de los N-formilpéptidos ésteres así formados hemos, además, descubierto que el tratamiento con alcoholes de bajo peso molecular en presencia de cloruro de tionilo conduce a muy buenos resultados. Por su sencillez este método de desformilación presenta notables ventajas sobre otras técnicas descritas en la literatura (Houben-Neyl, Methoden der organischen Chemie, Band 15, Teil 1, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1974, p. 167-169).

10.

De acuerdo con la presente invención para la preparación de los tri péptidos representados por la antecitada fórmula I se emplea un reactivo comprendido en el grupo formado por la dicitolohexilcarbodiimida, la 1-etoxi-carbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína y el dietilfosforil-cianuro, como agente de condensación peptídica entre los aminoácidos convenientemente protegidos en su grupo amino o carboxilo, y en particular entre un derivado L-prolínico de la fórmula general:

15.



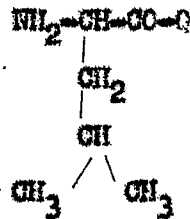
(Fórmula IV)

20.

donde R<sub>1</sub> representa 2 átomos de hidrógeno o uno de oxígeno y R<sub>2</sub> puede ser igual a un radical acilo de 1 a 8 átomos de carbono, como son los corrientemente empleados en química de péptidos para proteger el grupo amino de los aminoácidos (como por

ejemplo el radical formilo, el benzoiloxicarbonilo, el ter-butiloxicarbonilo, etc.) y un derivado de la L-leucina de fórmula general: - - - - -

5.



(Fórmula V)

donde Q representa un radical alquiloxi o aralquiloxi o un resto derivado de la glicina de fórmula general: - - - - -

10.



(Fórmula VI)

donde W es igual a un radical alquiloxi de 1 a 4 átomos de carbono o a un radical amino o a un alquilamino de 1 a 7 átomos de carbono. - - - - -

15.

Cuando en la fórmula V, Q representa el resto glicilo definido por la fórmula VI, el producto intermediario así representado corresponde a un éster o amida de la L-leucil-glicina. - - - - -

20.

También de acuerdo con la invención se protegen preferentemente el grupo nitrogenado de la L-prolina y el de la L-leucina por formilación, antes de proceder a las condensaciones peptídicas en las cuales toman parte sus grupos carboxílicos libres, llevando posteriormente a cabo la desformilación de los N-formil-péptidos mediante tratamiento con alcoholes de

5. bajo peso molecular en presencia de cloruro de tionilo, siempre y cuando estos péptidos sean ésteres de esos mismos alcoholes. Si el producto final de las condensaciones peptídicas es un tripéptido éster el tratamiento de éste con ananinase o con amidas conducirá al derivado de la fórmula general I. - -

10. Evidentemente y sin que forme parte de la invención por encontrarse descrito en las síntesis de los productos de fórmula general I publicadas en la literatura, al utilizar otros grupos bloqueadores que no sean el formilo, puede llevarse a cabo el desbloqueo de tales grupos siguiendo los métodos clásicos bien conocidos, como son, por ejemplo, la hidrogenación catalítica para los derivados N-benciloxicarbonilados.

15. Como en la síntesis de cualquier péptido, la de los productos de la fórmula I puede empezarse por uno cualquiera de los dos extremos, es decir, en este caso, a partir de un derivado prolinico de la fórmula general IV o a partir de un derivado de la glicina que tenga libre el grupo amino, y en el cual el grupo carboxílico esté bloqueado en forma de éster o de amida. En ambos casos se aplican, según la invención, las condiciones descritas basadas esencialmente en la utilización de los reactivos de condensación señalados y en la protección por formilación de los grupos nitrogenados de los aminoácidos ésteres o de los péptidos ésteres. - - - - -

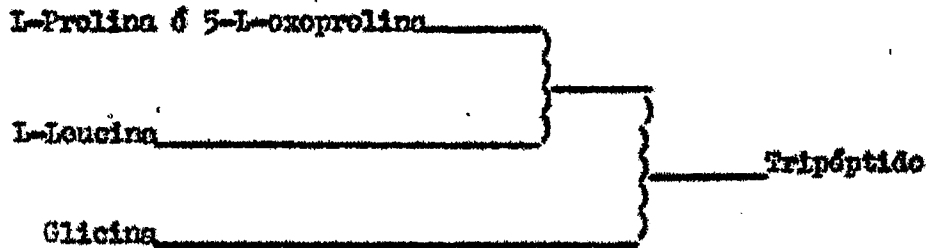
20. En comparación con los procedimientos descritos en la literatura para la síntesis de los tripéptidos de la fórmula

25.

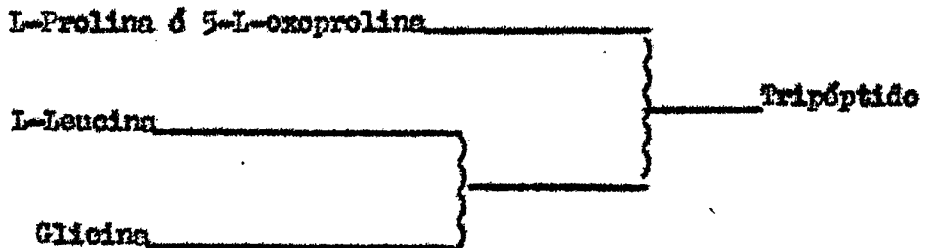
la I, el procedimiento objeto de esta patente resulta particularmente ventajoso por su comodidad y economía. - - - - -

Los esquemas siguientes resumen las distintas maneras de proceder a la síntesis de los tripéptidos de la fórmula general I, mostrando sólo el orden en el cual se condensan los aminoácidos pero no la verdadera manera según la cual se efectúan dichas condensaciones, ni los grupos protectores de la función amina y de la función carboxílica: - - - - -

5.



10.



15.

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

EJEMPLO 1

N-formil-L-leucil-glicina metil éster

5.

Ochenta gramos (0,5 moles) de L-formil-L-leucina (Heubner-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band XV/1, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1974, pag. 170), 55 g (0,48 moles) de clorhidrato de glicina metil éster (volumen antes citado, pag. 325) se suspenden en 400 ml. de cloruro de metileno. Se enfría la suspensión a 0-5° y se agregan 70 ml (0,5 moles) de trietilamina. Se agita durante 10 minutos y se agregan 125 g (0,6 moles) de diciclohexilcarbodiimida. Se deja en agitación durante 2 horas a la misma temperatura. Se filtra la diciclohexilurea y se lava con una mezcla de éter etílico-cloruro de metileno 8:2. Los filtrados se concentran al vacío; al residuo se le agrega éter-cloruro de metileno 9:1, se agita y se filtra el clorhidrato de trietilamina insoluble. - - - - -

10.

15.

Los filtrados se concentran al vacío. Al residuo se le agregan 500 ml de éter isopropílico para que cristalice. Se enfría, filtra y lava con éter isopropílico. - - - - -

Se obtienen 95 g de dipéptido (Rendimiento 82%). - - - - -

20.

El producto funde a 76°C (Banco de Kofler), es homogéneo a la cromatografía en capa fina y presenta un poder rotatorio de -54° (c= 2,5% en etanol). - - - - -

EJEMPLO 2

N-formil-L-leucil-glicina metil éster

5. Se suspenden 15,9 g (0,1 mol) de L-formil-L-leucina y 11,3 g (0,1 mol) de glicina metil éster clorhidrato en 75 ml de cloruro de metileno. Se enfría a 0-5°C y se agregan 14 ml (0,1 moles) de trietilamina. Se agita durante 10 minutos y se agregan de una sola vez 25 g (0,11 moles) de 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína. Se agita durante 10 minutos a la misma temperatura y después durante 3 horas a la temperatura ambiente. Se concentra al vacío. Al residuo se le agregan 125 ml de éter etílico, se enfría y se filtra lavando el residuo insoluble con éter etílico. - - - - -

10. Los filtrados se concentran al vacío. Al residuo se le agregan 175 ml de éter isopropílico y se agita durante 30 minutos para que cristalice. Se enfría en el refrigerador y se filtra lavando con éter isopropílico. - - - - -

15. Se obtienen 19,8 g de dipéptido (Rendimiento, 86%). El producto presenta un punto de fusión (Densp de Kofler) de 71° C y es homogéneo a la cromatografía en capa fina. - - - - -

20. EJEMPLO 3

Clorhidrato de L-leucil-glicina metil éster

Se disuelven 62 g de N-formil-L-leucil-glicina metil

éster en 200 ml de alcohol metílico. Se enfría la solución a 0-5° y se agregan, gota a gota, 12 ml de cloruro de tionilo. Se deja después en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Se concentra al vacío. Al residuo se le agrega alcohol metílico y se destila al vacío repitiendo la operación 2 veces más para eliminar el exceso de ácido clorhídrico. El residuo, que no cristaliza, pesa 85 g. El producto es homogéneo a la cromatografía en capa fina y por ello se utiliza sin ulterior purificación para la siguientes reacciones: - - - - -

5.

EjemPlo 4

N-carbobenzoxi-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster

15.

Se suspenden 59 g (248 mM) de L-leucil-glicina metil éster obtenido según el ejemplo 3, y 61,5 g (246 mM) de N-carbobenzoxi-L-prolina [Saoral, B.; Chemické Listy, 48, 1583 (1954) 7, en 300 ml de cloruro de metileno. Se enfría la suspensión a 0-5° en baño de agua-hielo y se agregan 35 ml (250 mM) de trietilamina. Se deja 10 minutos en agitación y se agregan 55 g (267 mM) de dicitclohexilcarbodiimida. Se continúa la agitación durante 2 horas a la misma temperatura durante 2 horas. La reacción se vierte sobre 500 ml de éter etílico, se agita durante 5 minutos y se filtra el clorhidrato de trietilamina y la dicitclohexilurea insolubles. - - - - -

20.

Los filtrados se concentran al vacío. Al residuo se le agrega una mezcla formada por 75 ml de solución acuosa de

turada de bicarbonato sódico, 75 ml de agua y 150 ml de éter isopropílico. Se agita enérgicamente durante 15 minutos para que cristalice el producto. Se enfría y filtra, lavando primero con agua y después con éter isopropílico. - - - - -

5. Se obtienen 80 g de tripéptido (Rendimiento 75,5%). Sobre el banco de Kefler presenta un primer punto de fusión aproximadamente a 72° C, después solidifica y vuelve a fundir a 121° C. El producto es homogéneo a la cromatografía en capa fina y presenta un poder rotatorio de -70° (C = 2% en etanol).

10.

EJEMPLO 5

N-carbobenzoil-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster

15.

Se disuelven 2 g (8,4 mM) de L-leucil-glicina metil éster clorhidrato, junto con 2,07 g (8,3 mM) de N-carbobenzoil-L-prolina, en 15 ml de cloruro de metileno. A esta solución se le agregan 1,2 ml (8,55 mM) de trietilamina y a continuación 2,5 g (10,02 mM) de 1-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína. - - - - -

20.

La solución transparente se agita durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Se concentra al vacío y al residuo se le agrega éter etílico para precipitar el clorhidrato de trietilamina. Se filtra y lava con éter etílico. Los filtrados se concentran al vacío y al residuo se le agrega una mezcla formada por solución saturada de bicarbonato sódico y éter isopropílico y se agita enérgicamente. Una vez cristalizado el tri-

péptido éster se enfría en el refrigerador y se filtra, lavando primero con agua y después con éter isopropílico. - - - - -

Se obtienen 2,2 g de producto (Rendimiento, 61%). -

5.

El producto funde primero a 72°C, solidifica y vuelve a fundir a 121° C. A la cromatografía en capa fina no presenta contaminaciones. - - - - -

EJEMPLO 6

N-Carbobenzoil-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster

10.

Se disuelven 2,40 g (10 mM) de clorhidrato de L-leucil-glicina metil éster y 2,50 g (10 mM) de N-carbobenzoil-L-prolina en 12 ml de dimetilformamida. Se enfría a -5°C y se agregan 1,44 ml de trietilamina. Después de agitar durante 5 minutos se agregan 1,7 ml de dietilfosforil-cianuro de una sola vez. Inmediatamente se inicia la adición, gota a gota, de una solución formada de 1,44 ml de trietilamina en 2 ml de dimetilformamida. - - - - -

15.

La adición dura unos 10 minutos. Una vez finalizada se agita durante 1,5 horas a 0-5°, y después durante dos horas a temperatura ambiente. Se diluye con éter etílico, se enfría y se filtra el clorhidrato de trietilamina insoluble. Los filtrados se concentran al vacío. Al residuo se le agrega una mezcla de éter isopropílico y solución acuosa de bicarbonato de sodio. Se agita enérgicamente hasta que cristaliza el pro-

20.

ducto. Se enfría y filtra lavando primero con agua y después con éter isopropílico. - - - - -

Se obtienen 1,85 g de producto que funde a 75°C, solidifica y vuelve a fundir a 121-123°C. - - - - -

5.

Para obtener la forma de alto punto de fusión el producto se disuelve en cloruro de metileno y se concentra destilando a presión atmosférica. Al residuo solventado con cloruro de metileno se le agrega éter isopropílico con lo que cristaliza la forma de punto de fusión de 123°C. - - - - -

10.

El producto presenta un poder rotatorio de -82,5° (en 2% en etanol). - - - - -

EjemPlo 7

N-carbobenzoxi-L-prolil-L-leucil-glicinamida

15.

Se disuelven 866 mg (2 ml) de N-carbobenzoxi-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster obtenido según los ejemplos 4, 5 ó 6 en 10 ml de metanol). Se enfría la solución a 0-5° y se pasa una corriente de  $\text{NH}_3$  gaseoso y seco hasta saturación. Se cierra el matraz herméticamente y se deja a temperatura ambiente durante 20 horas. - - - - -

20.

Se concentra al vacío y al residuo se le agrega éter etílico y se disgrega el producto que cristaliza. Se enfría, se filtra, y se lava con éter etílico. - - - - -

Se obtienen 0,75 g de producto (89,2 % de rendimiento). Sobre el banco de Kofler el producto presenta un punto de fusión de 160°C. Su poder rotatorio es de -66,5° (c = 2% etanol). -----

5.

La literatura [Cash, W.D., Journal of Organic Chemistry, 26, 2136 (1961)] señala un punto de fusión de 161-163°C y un poder rotatorio de -73,3° (c = 2% en etanol de 95%). -----

EJEMPLO 8

10.

N-carbobenzoxi-L-prolil-L-leucil-glicinamida

Se disuelven 80 g de N-carbobenzoxi-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster en 75 ml de metanol. Se le agregan 200 ml de amoníaco concentrado y se agita durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se enfría en el refrigerador y se filtra. -----

15.

Se obtienen 72 g de producto (Rendimiento: 93%). El producto funde a 159° y presenta un poder rotatorio de -68° (c = 2% etanol). A la cromatografía en capa fina no se observa la presencia de productos contaminantes. -----

20.

EJEMPLO 9

L-prolil-L-leucil-glicinamida

Se disuelven 72 g de N-carbobenzoxi-L-prolil-L-leucil-glicinamida obtenida según el ejemplo 7 u 8 en 300 ml de

metanol. Se agrega 1 g de catalizador de paladio al 10% sobre sulfato bórico y se deja agitando en atmósfera de hidrógeno hasta que ya no se observa consumo de hidrógeno (aproximadamente 1 hora). -----

5. Se filtra sobre Hyflosupercel y se concentra al vacío. Al residuo se le agrega acetato de etilo para que cristalice. Se enfría y se filtra, lavando con acetato de etilo frío. -----

10. Se obtienen 37 g de tripéptido (Rendimiento 77%) con un punto de fusión de 116-117°C y un poder rotatorio de -50° (c = 2% en etanol). La literatura [Catansson, S. y col., FEBS Letters, 44, 101 (1974)], señala un punto de fusión de 112-113,5°C y un poder rotatorio de -48,8° (c = 1% en metanol).

El producto es homogéneo a la cromatografía en capa fina. -----

15. EJEMPLO 10

L-prolil-L-leucil-glicina metil éster

20. Se disuelven 8 g de N-carbobenzoil-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster obtenido según el ejemplo 4, 5 ó 6 en 40 ml de metanol. Se agregan 400 mg de paladio al 10% sobre sulfato bórico y se agita bajo atmósfera de hidrógeno durante 90 minutos. Se filtra sobre Hyflosupercel y se concentra al vacío. El residuo se trata con acetato de etilo-metanol con lo

que precipitan 150 mg de productos secundarios contaminantes. Se filtra y se concentra a sequedad al vacio quedando un residuo amorfo de 5,0 g de L-prolil-L-leucil-glicina metil éster

EJEMPLO 11

5.

L-prolil-L-leucil-glicinamida

Se disuelven 4 g de L-prolil-L-leucil-glicina metil éster obtenido según el ejemplo 10 en 5 ml de metanol. Se agregan 20 ml de amoníaco concentrado y se deja agitando durante 1 hora a la temperatura ambiente. Se diluye con etanol y se concentra al vacio. Se agrega de nuevo etanol absoluto al residuo y se concentra nuevamente al vacio. El residuo solvata- do con etanol se trata con acetato de etilo para que cristali- ce. -----

10.

15.

Se obtienen 2,9 g de triptéptido (Rendimiento: 76,5%) con un punto de fusión de 116°. El producto es homogéneo a la cromatografía en capa fina. -----

EJEMPLO 12

20.

N-Carbobenzoxi-L-prolil-L-leucil-glicinamida

Se trata una suspensión de 2,07 g (8,3 mm) de N-carbobenzoxi-L-prolina y 2,22 g (8,3 mm) de L-leucil-glicinamida bromhidrato [Boissonnas y col., Helvetica Chimica Acta, 38, 1491 (1955)] en 20 ml de tetrahidrofurano enfriada a 0-5°C, con 1,2 ml (8,55 mm) de trietilamina y se agita durante 15 mi-

5. minutos. Se agregan 1,82 g (8,4 mM) de dicitclohexilcarbodiimida, se agita durante dos horas a 0-5°C y después 1 hora a temperatura ambiente. Se filtra la dicitclohexilurea y el bromhidrato de trietilamina insolubles, se evapora a sequedad el filtrado y se cristaliza el residuo añadiendo acetato de etilo. El producto obtenido es idéntico al descrito en los ejemplos 7 u 8. - - - - -

EJEMPLO 13

N-acetil-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster

10. Se disuelven 7 g de clorhidrato de L-leucil-glicina metil éster y 4,5 g de N-acetil-L-prolina [Barbaum S.H. y col., Journal of Biological Chemistry, 194, 455 (1952)] en 30 ml de cloruro de metileno. Se enfría la solución a 0-5°C y se agregan 4,2 ml de trietilamina. Después de 5 minutos en agitación se agregan de una sola vez 7,5 g de dicitclohexilcarbodiimida. Se deja 2 horas en agitación permitiendo que la temperatura aumente gradualmente hasta 15 a 20°C. - - - - -
- 15.

20. Los productos de la reacción se vierten sobre 100 ml de éter etílico. Se agita durante 5 minutos y se filtra el clorhidrato de trietilamina y la dicitclohexilurea insolubles. Los filtrados se concentran al vacío. Al residuo se le agrega una mezcla de éter isopropílico y agua. Se filtra la dicitclohexilurea que precipita, se decanta la solución acuosa que se concentra al vacío, obteniendo el producto como un aceite in-

coloro, homogéneo a la cromatografía en capa fina. El producto se utiliza tal cual para la siguiente reacción. - - - -

EJEMPLO 14

N-acetil-L-prolil-L-leucil-glicinamida

5.

El éster metílico de la N-acetil-L-prolil-L-leucil-glicina obtenido según el ejemplo 13 se disuelve en 25 ml de amoníaco concentrado. Se deja en agitación durante 1 hora y se concentra al vacío. Al residuo se le agrega etanol absoluto y se concentra al vacío, repitiendo la operación una vez más para deshidratar el residuo. Este se disuelve en acetona caliente, se filtra sobre hyflosupercel y el producto cristaliza por enfriamiento. Se filtra y lava con acetona fría. - -

10.

Se obtienen 3 g de producto con un punto de fusión de 169°C y un poder rotatorio de -36° (c = 2% en etanol absoluto). El producto es idéntico al obtenido por tratamiento de la L-prolil-L-leucil-glicinamida con anhídrido acético. - -

15.

EJEMPLO 15

N-formil-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster

20.

Se disuelven 7 g de clorhidrato de L-leucil-glicina metil éster y 4,2 g de N-formil-L-prolina [Loase G. y Hadolski, D., Journal für Praktische Chemie 24, 118 (1954)] en 30 ml de cloruro de metileno y se enfrían en baño de agua y hielo a

0-5°C. Se agregan 4,2 ml de trietilamina, y después de 5 minutos de agitación se agregan de una sola vez 75 g de dicitohexilcarbodiimida. Se deja 2 horas en agitación permitiendo que la temperatura aumente gradualmente hasta 15 a 20°C. - -

5.

La reacción se vierte sobre 100 ml de éter etílico, se agita durante 5 minutos y se filtra la dicitohexilurea y el clorhidrato de trietilamina insolubles. Los filtrados se concentran al vacío obteniendo un producto amorfo, prácticamente homogéneo a la cromatografía en capa fina. Este éter se utiliza tal cual para la siguiente reacción. - - - - -

10.

EJEMPLO 16

N-formil-L-prolil-L-leucil-glicinamida

El éster metílico de la N-formil-L-prolil-L-leucil-glicina obtenido según el ejemplo 15 se disuelve en 25 ml de acetato concentrado. Se deja 1 hora en agitación y se concentra al vacío. Al residuo se le agrega etanol y se concentra, repitiendo la operación dos veces más. Se concentra finalmente a sequedad, obteniendo un sólido amorfo, higroscópico. El producto funde a alrededor de 80°C y no presenta contaminación a la cromatografía en capa fina. - - - - -

15.

EJEMPLO 17

L-piroglutamil-L-leucil-glicina metil éster

Se disuelven 2,40 g (10 mM) de clorhidrato de L-leu

20.

- oil-glicina metil éster obtenido por desformilación de 2,30 g de N-formil-L-leucil-glicina metil éster, en 20 ml de cloruro de metileno. Se añaden 1,30 g (10 mM) de ácido L-piroglutámico, se enfría a 0-5°C y se agregan 2,10 g (10 mM) de dicitclohexilcarbodiimida. Se agita a la misma temperatura durante dos horas y después durante dos horas más a la temperatura ambiente. Se filtra la dicitclohexilurea insoluble, se evapora a sequedad y el residuo se trata con 20 ml de dimetilformamida. Se filtra el clorhidrato de trietilamina insoluble y se concentra a sequedad al vacío de la bomba y a una temperatura inferior a los 60°. - - - - -
- 5.
- 10.

El residuo aceitoso se disuelve en acetato de etilo. Si es necesario se filtra la dicitclohexilurea que haya podido quedar y raspando las paredes o sembrando la solución se hace cristalizar el producto. Se filtra y lava con acetato de etilo obteniendo 2,20 g de producto con un punto de fusión de 150° y un poder rotatorio de -42° (c = 2% en metanol). - -

15.

EJEMPLO 18

L-piroglutamil-L-leucil-glicina metil éster

- Se disuelven 2,40 g (10 mM) de clorhidrato de L-leucil-glicina metil éster y 1,30 g (10 mM) de ácido L-piroglutámico en 8 ml de dimetilformamida. Se enfría a -10° y se añaden 1,40 ml (10 mM) de trietilamina. Después de agitar durante 5 minutos se añade de una sola vez 1,70 ml (11,2 mM) de
- 20.

5. dietilfosforilcianuro, e inmediatamente se empieza la adición, gota a gota, de una solución de 1,40 ml (10 ml) de trietilamina en 2 ml de dimetilformamida. La adición dura aproximadamente de 10 a 15 minutos. Se agita durante 30 minutos a -5° y después de 1 a dos horas a la temperatura ambiente. - - -

Se filtra el clorhidrato de trietilamina, se evapora al vacío de la bomba la dimetilformamida y se trata el residuo con acetato de etilo. De la solución obtenida, rascando las paredes o sembrando, cristaliza lentamente el producto. -

10. Se obtienen 1,700 g de péptido idéntico en todos los aspectos al producto descrito en el ejemplo 17. - - - - -

EJEMPLO 19

L-pirrolutamil-L-leucil-glicinamida

15. Se tratan 2,50 g de L-pirrolutamil-L-leucil-glicina metil éster obtenido según el ejemplo 17 ó 18, con 20 ml de amoníaco concentrado, agitando a temperatura ambiente. Al cabo de 5 a 10 minutos se observa la disolución completa del producto. Después de 10 minutos más de reacción se concentra al vacío, se deshidrata el residuo por adición de etanol-etileno seguido de destilación y se cristaliza el residuo por adición de acetato de etilo. - - - - -
- 20.

Se obtienen 1,870 g de producto con punto de fusión de 170° que por recristalización en acetato de etilo-etanol rinde 1,050 g de tripéptido amida con un punto de fusión

de 175° y un poder rotatorio de -17° (c = 2% en metanol). -

La literatura [Castensson, S. y col., FEBS Letters, 44, 101, (1974), 7], señala un punto de fusión de 175° y un poder rotatorio de -17° (c = 1% en metanol/.

5.

EJEMPLO 20

N-Formil-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster

10.

Se disuelven 7,15 g de clorhidrato de L-leucil-glicina metil éster y 4,33 g de N-formil-L-prolina en 30 ml de cloruro de metileno. Se enfría la solución en baño de agua con hielo y se agregan 4,3 ml de trietilamina. Se deja en agitación durante 5 minutos, y se adicionan 6,5 g de dicitclohexilcarbodiimida de una sola vez. Se deja en agitación durante 2 horas, sin retirar el baño refrigerante. Se añaden 100 ml de éter etílico y se filtra la dicitclohexilurea y el clorhidrato de trietilamina insolubles. Los filtrados se concentran al vacío. El residuo se disuelve en agua y se extrae la solución una vez con éter etílico. La solución etérea se lava una vez con agua. Se reúnen las soluciones acuosas y se concentran al vacío. Al residuo se le agrega metanol y se destila repitiendo la operación una vez más para deshidratar el residuo. - - -

15.

20.

Se obtienen 8,5 g de producto (Rendimiento = 86,5%) en forma de aceite. El producto se presenta suficientemente puro a la cromatografía en capa fina y se utiliza tal cual pa-

ra la siguiente reacción. - - - - -

**EJEMPLO 21**

**Clorhidrato de L-prolil-L-leucil-glicina metil éster**

5.

Se disuelven 8,5 g de N-formil-L-prolil-L-leucil-glicina metil éster en 30 ml de metanol. Se enfría con baño de agua-hielo y se agregan 22 ml de cloruro de tionilo. Se retira el baño refrigerante y se deja durante 24 horas a temperatura ambiente. Se concentra al vacío, se agrega benceno al residuo y se destila al vacío, repitiendo la operación una vez más. - - - - -

10.

Se obtienen 7,5 g de producto (Rendimiento = 87%) amorfo, suficientemente puro según la cromatografía en capa fina para ser utilizado en la reacción siguiente. - - - - -

**EJEMPLO 22**

**L-prolil-L-leucil-glicinamida**

15.

El producto obtenido según se describe en el ejemplo 21 se deja en agitación durante 30 minutos con 15 ml de amoníaco concentrado. Se elimina el amoníaco al vacío a temperatura ambiente, y cristaliza el producto desecado. Se enfría en el refrigerador y se filtra lavando con agua fría. -

20.

Se obtienen 4,5 g de L-prolil-L-leucil-glicinamida (Rendimiento = 73,5%) con un punto de fusión de 118-119°

y un poder rotatorio de  $-47,5^{\circ}$  ( $c = 2\%$  en etanol absoluto).

Habiendo descrito convenientemente unos ejemplos de realización de la invención, debe hacerse constar que los mismos tienen carácter ilustrativo y no limitativo y que se podrán introducir cuantas variantes de detalle la experiencia y la práctica puedan aconsejar, siempre que con ello no se desvirtúe la esencialidad de la presente invención, que es la que se resume y concreta en la siguiente. - - - - -

5.

N O T A

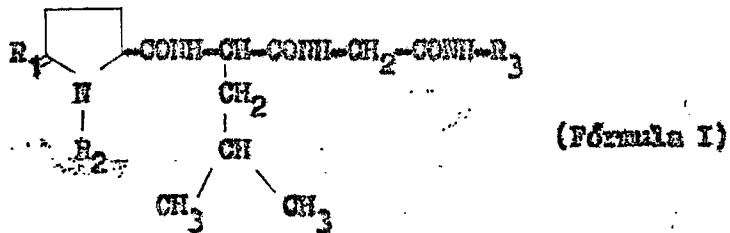
10.

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

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

1.- Procedimiento para la preparación de triptóidos derivados de la L-prolina, de la fórmula general: - - - - -

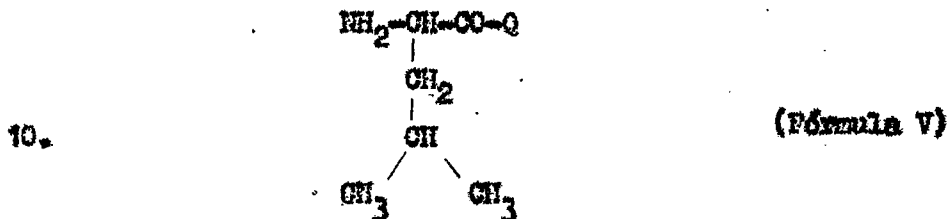
15.



20.

donde  $R_1$  representa dos átomos de hidrógeno o uno de oxígeno,  $R_2$  representa un átomo de hidrógeno o un grupo acilo de 1 a 8 átomos de carbono y  $R_3$  representa un átomo de hidrógeno

5. no o un radical alcoholo de 1 a 4 átomos de carbono y donde el 2º resto aminoácido corresponde a L-leucina, caracterizado por comprender el empleo de un reactivo del grupo formado por el dietilfosforil cianuro, la 1-etoxi-carbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína y la dicitclohexilcarbodiimida como agentes de condensación entre las unidades peptídicas que integran la molécula, y un derivado de la L-leucina de fórmula:

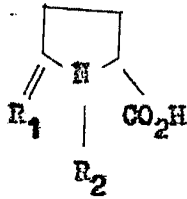


donde O representa un radical alquiloxi o aralquiloxi o un resto derivado de la glicina de la fórmula: - - - - -



15. donde W representa un radical alquiloxi de 1 a 4 átomos de carbono o un radical amino o un alquilamino de 1 a 7 átomos de carbono. - - - - -

20. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la unidad peptídica es un derivado L-prolínico de la fórmula general: - - - - -



(Fórmula IV)

5.

en la cual  $R_1$  representa 2 átomos de hidrógeno o 1 de oxígeno y  $R_2$  un radical acilo de 1 a 8 átomos de carbono. - - - -

10.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por utilizar como aminoácidos protegidos en su grupo amina los derivados N-formilados, en las condensaciones peptídicas en las que intervengan los grupos carboxílicos libres de tales derivados. - - - - -

15.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por proceder a la desformilación de los N-formil dipéptidos o tripéptidos ésteres intermediarios mediante tratamiento con alcoholes alifáticos de bajo peso molecular en presencia de cloruro de tionilo. - - - - -

20.

5.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por utilizar en las condensaciones peptídicas, como derivados con el grupo amina libre, tanto los ésteres como las amidas de la glicina y de la L-leucil-glicina. - - -

6.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por efectuar las condensaciones peptídicas en un disolvente orgánico aprótico como el cloruro de metileno, el tetrahidrofurano o la dimetilformamida, y a bajas tempera-

turas comprendidas preferentemente entre 40 y 100 C. -----

7.- "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE TRIPLETOS DERIVADOS DE LA L-PROLINA". -----

5. Todo ello tal como se describe y reivindica en la presente memoria que consta de treinta hojas foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

*Alberich*