



17 FEB. 1978 (19) ES

(11) NUMERO	(10) A 1
(21) 452537	
(22) FECHA DE PRESENTACION	

CONCEDIDA

PATENTE DE INVENCION

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO		
684.321	7 de mayo de 1.976	EE.UU. de A.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(52) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C/A61K	

(64) TITULO DE LA INVENCION

PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR ENCEFALINAS 2- Y 3-SUSTITUIDAS.

(71) SOLICITANTE (S)

G.D. SEARLE & CO.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

P.O. Box 5110, Chicago, Illinois 60680, EE.UU. de A.

(72) INVENTOR (ES)

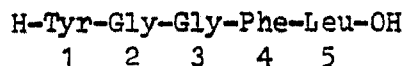
David Ackley Jones, Jr., James Myron Schlatter, Richard Andrew mikulec, Judith Ann Reuter y Robert Henry Mazur.

(73) TITULAR (ES)

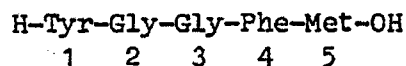
(74) REPRESENTANTE

GOMEZ-ACEBO.

Esta invención se relaciona con un procedimiento para preparar análogos de encefalina que exhiben una actividad agonistas en los receptores de opio. La encefalina, un pentapéptido de origen natural, ha sido aislado y encontrado como una mezcla de dos pentapéptidos que solamente difieren en el aminoácido presente en la posición 5. De este modo, la leucina⁵-encefalina se representa por la siguiente fórmula estructural:

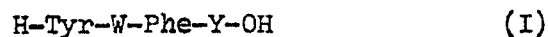


y la metionina⁵-encefalina se representa por la siguiente fórmula:

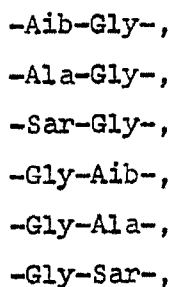


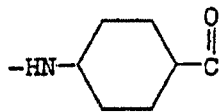
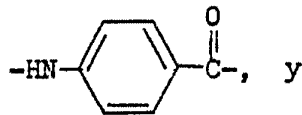
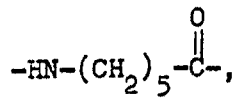
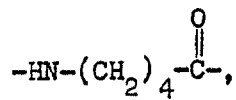
en donde los residuos Tyr, Met y Leu son todos ellos de la configuración estereoquímica L.

La presente invención se relaciona con un procedimiento para preparar nuevos análogos de leucina⁵-encefalina y metionina⁵-encefalina. Más particularmente, esta invención se relaciona con la producción de análogos de encefalina de fórmula:



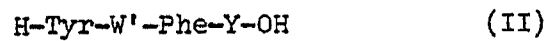
en la que Y representa Leu o Met; W se elige del grupo consistente en:



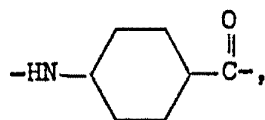
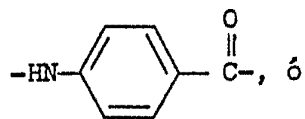
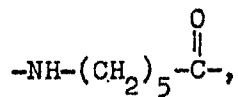
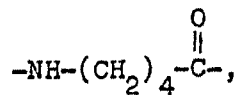


5 y la configuración estereoquímica de cada uno de los residuos aminoácidos ópticamente activos es D, L ó DL.

Compuestos preferidos obtenidos por esta invención son aquellos de fórmula:

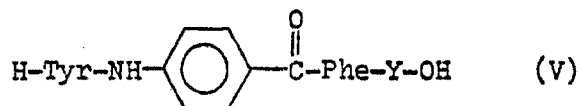
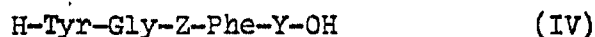
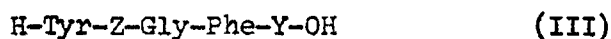


10 en donde W' es



e Y se define como anteriormente, siendo L la configuración estereoquímica de cada uno de los residuos aminoácidos opticamente activos.

Compuestos particularmente preferidos, y obtenidos por esta invención, son aquellos de fórmulas:



en donde Y se define como anteriormente y Z representa Aib, Ala ó Sar y la configuración estereoquímica de cada uno de los residuos aminoácidos opticamente activos es L.

Las abreviaturas representan los aminoácidos definidos de acuerdo con las normas de nomenclatura publicadas por IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature en Biochem. J., 126, 773-780 (1972). Los aminoácidos tienen la configuración estereoquímica L a menos que se diga lo contrario.

Equivalentes a los compuestos antes formulados, para los fines de esta invención, son los solvatos de los mismos en los cuales están presentes cantidades de disolvente biologicamente insignificantes.

Igualmente, equivalentes a los compuestos de fórmula (I), para los fines de esta invención, son sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Dichas sales de adición de ácido se pueden derivar de diversos ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como sulfúrico, fosfórico, clorhídrico bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfámico, cítrico, láctico, pirúvico, oxálico, maléico, succínico, tartárico, cinnámico, acético, trifluoracético, benzóico, salicílico, glucónico,

ascórbico y ácidos relacionados.

Los compuestos obtenidos por la presente invención son útiles en consecuencia de sus valiosas propiedades farmacológicas. Por ejemplo, dichos compuestos son agonistas en puntos receptores de opio. Tales agonistas son útiles como analgésicos, antagonistas de narcóticos y agentes antidiarréicos.

El ensayo utilizado para la detección de la actividad agonista en puntos receptores de opio, es una modificación de la técnica descrita por Pert, Snowman y Snyder, en Brain Research, 70, 184 (1974).

Los detalles de este ensayo son los siguientes: se sacrifican cobayo de 600-700 g de peso y se extraen todos los cerebros y se homogenizan en sucrosa 0,32 M después de la separación del cerebelo. El homogenato se centrifuga a 1.000 x g. durante 10 minutos. El pellet se somete un choque osmótico con agua fría como el hielo y se recentrifuga a 10.000 X g. durante 10 minutos. La parte sobrenadante resultante, que contiene la fracción de membrana utilizada para el ensayo de aglutinación, se diluye con tampón tris 0,06 M (pH 7,4 a 25°C) a una concentración de proteína de 2 mg/ml.

Partes alicuotas de la suspensión final de membrana se incuban con diversas concentraciones del compuesto de ensayo. Las partes alicuotas incubadas con levorfanol 10^{-6} M se utilizan para determinar la aglutinación no específica del ligando radioactivo. El ensayo se lleva a cabo a 4°C y se inicia con la adición de 8nM ^3H -naloxona (actividad específica superior a 20 C/mmol). La reacción se termina por filtración rápida de la mezcla de incubación sobre papeles de filtro de vidrio GF/B. Las membranas atrapadas en el papel de filtro

se lavan dos veces con tampón Tris enfriado con hielo. La cantidad de ligando radioactivo ligado se determina por técnicas de escintilación líquida. Se determina una concentración ID_{50} de la aglutinación 3H -naloxona a partir de curvas de log-probit del porcentaje de inhibición de la aglutinación de 3H -naloxona contra la concentración del compuesto de ensayo.

El ensayo in vitro descrito es ampliamente conocido para correlacionarse con las propiedades antagonistas-agonistas relativas in vivo; Nature, vol. 247, 11 enero, 1974.

Cuando se ensayan mediante esta prueba agonistas-antagonistas conocidos, tales como morfina y metadona, en ausencia de ión sodio, los mismos tienen concentraciones ID_{50} de $1,2 \times 10^{-8}$ y $2,4 \times 10^{-8}$ respectivamente.

Igualmente, es conocido que las afinidades receptoras en el ileo son similares en sus características de aglutinación con aquellas del cerebro. Lars Terenius, Acta. Pharmacol. et Toxicol., 37, 211-221 (1975). Los conocimientos disponibles indican que las drogas que actúan sobre los receptores de opio del ileo causan constipación y, por consiguiente, son útiles como agentes antidiarréicos.

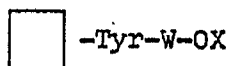
Los compuestos de fórmula (I) se pueden combinar con diversos vehículos farmacéuticos típicos, para proporcionar composiciones adecuadas para utilizarse como analgésicos, como antagonistas de narcóticos útiles en el tratamiento de la adicción a drogas, y como agentes antidiarréicos. La dosificación de estos compuestos depende de varios factores, tales como el compuesto particular empleado y la respuesta particular obtenida. Las dosis típicas para utilizarse como analgésico, varían de 0,1 a 6 mg/kg por día administrado parenteralmente.

5 El procedimiento de producción de los nuevos com-
puestos se consigue convenientemente mediante procesos adap-
tados a la síntesis de péptidos, es decir tanto síntesis en
solución como síntesis de péptidos en fase sólida. En el caso
de síntesis en solución, el orden en el cual se combinan los
aminoácidos no es crítico. De este modo, el pentapéptido se
puede producir mediante acoplamiento de dos cualquiera de las
unidades adecuadas que contienen los aminoácidos deseados.

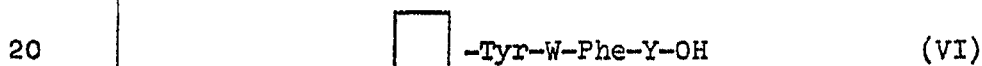
10 Un método conveniente para preparar los compuestos
de esta invención comprende el acoplamiento de un dipéptido
C-terminal, opcionalmente sustituido con grupos protectores,
de fórmula:



15 en donde Y se define como anteriormente, con un éster activo
N-prottegido de fórmula:



en donde W se define como anteriormente, \square es un grupo
N-protector y X es un grupo éster activo, para dar un péptido
N-prottegido de fórmula:



El péptido N-bloqueado de fórmula (VI) se desprote-
ge a continuación de forma convencional para proporcionar el
péptido deseado de fórmula (I).

25 La reacción de acoplamiento anterior se efectúa en
un disolvente orgánico adecuado tal como cloruro de metileno,
dimetilformamida o tetrahidrofurano. El empleo de una base or-

gánica, tal como N-metilmorfolina facilita la reacción.

Alternativamente, el péptido deseado se puede obtener mediante síntesis de péptidos en fase sólida, que consiste primeramente en la unión a un soporte polímero, por ejemplo un polímero de copoliestireno 1 % divinilbenceno clorometilado, del aminoácido C-terminal opcionalmente N-prottegido, seguido por la separación del grupo N-protector y acoplamiento, en presencia de un reactivo adecuado, por ejemplo diciclohexilcarbodiimida, sucesivamente con cada uno de los aminoácidos N-prottegidos adecuados.

Esteres activos adecuados para utilizarse en esta invención son aquellos que causan que la función ácida del aminoácido sea más reactiva, tales como ésteres alquílicos con sustituyentes sustraedores de electrones (negativos), ésteres vinílicos, ésteres enólicos, ésteres fenílicos, ésteres tiofenílicos, ésteres nitrofenílicos, ésteres 2,4-dinitrofenílicos, ésteres triclorofenílicos y ésteres nitrofeniltiólicos. El empleo de ésteres 2,4,5-triclorofenílicos es particularmente preferido para la preparación de los presentes compuestos.

Las funciones amino de los intermediarios de esta invención pueden protegerse mediante grupos amino-protectores normalmente utilizados, tales como grupos arilalquilo inferior tal como grupos difenilmetilo o trifenilmetilo, que están opcionalmente sustituidos por, por ejemplo, halógeno, nitro, alquilo inferior o alcoxi inferior; benzhidrilo, tritilo y di-parametoxibenzhidrilo; grupos acilo, tales como formilo, trifluoracetilo, eftaloilo, p-toluenosulfonilo, bencenosulfonilo, bencenosulfenilo y o-nitrofenilsulfenilo; grupos derivados de ácido carbónico o ácido tiocarbónico, tales como grupos

carbобенzoxi que están opcionalmente sustituidos en el radical aromáticos por átomos de halógeno, grupos nitro o grupos alquilo inferior, alcoxi inferior o carbalcoxi inferior, por ejemplo, carbобенzoxi, p-bromocarbобенzoxi ó p-fenilazobenciloxi
5 carbonilo y p-(p'-metoxifenilazo)benciloxicarbonilo, toliloxicarbonilo, 2-fenil-2-propoxicarbonilo, 2-tolil-2-propoxicarbonilo y 2-(parabifenil)-2-propoxicarbonilo; y grupos oxicarbonilo alifáticos, tales como t-butoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, t-amiloxicarbonilo. Un grupo
10 N-protector particularmente preferido para utilizarse en esta invención es el grupo t-butoxicarbonilo.

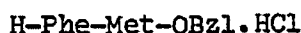
Los grupos amino pueden protegerse también formando enaminas, obtenidas por reacción del grupo amino con 1,3-dicetonas, por ejemplo benzoilacetona o acetilacetona.

15 Los grupos protectores se separan convenientemente por reacciones tales como reducción con sodio en amoniaco líquido, hidrogenolisis (por ejemplo, en presencia de un catalizador de negro de paladio), tratamiento con ácido hidrohálico (tal como ácidos bromhídrico, fluorhídrico o clorhídrico)
20 en ácido acético, o tratamiento con ácido trifluoracético.

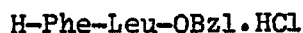
Los siguientes ejemplos describen detalladamente la preparación de compuestos ilustrativos de esta invención. Será evidente para los expertos en la técnica que pueden practicarse muchas modificaciones, tanto de materiales como de métodos,
25 sin desviarse de la finalidad e intención de esta invención. En todos los ejemplos aquí descritos, las temperaturas se ofrecen en grados centígrados y las cantidades relativas en partes en peso, a menos que se diga que se trata de partes en volúmen. La relación entre partes en peso y partes en volúmen
30 es la misma que existe entre gramos y ml.

EJEMPLO 1

Se agita durante la noche, a temperatura ambiente, una solución de 21,2 partes de éster de 2,4,5-triclorofenilo de N-t-butoxicarbonil-L-fenilalanina y 12,7 partes de éster bencílico de L-metionina en 200 partes de cloruro de metileno. El término de la reacción se determina por cromatografía de capa fina. El disolvente se separa entonces bajo presión reducida y el residuo en bruto se somete a cromatografía en columna a baja presión sobre gel de sílice. El producto resultante, éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-fenilalanil-L-metionina, se disuelve en 50 partes de dioxano y se agita con un exceso de 10 veces de ácido clorhídrico 2N en dioxano durante 10 minutos. El disolvente se separa por evaporación bajo presión reducida. El residuo sólido, después de la trituración con éter etílico, proporciona el hidrócloruro de éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina puro, representado por la siguiente fórmula:



El empleo de una cantidad equivalente de éster bencílico de L-leucina en lugar del éster bencílico de L-metionina en el procedimiento anteriormente detallado, proporciona el hidrócloruro de éster bencílico de L-fenilalanil-L-leucina representado por la fórmula:



EJEMPLO 2

Se agita durante la noche, a temperatura ambiente, una solución que contiene 19,5 partes de éster de 2,4,5-triclorofenilo de N-t-butoxicarbonilglicina y 13,8 partes de éster bencílico de L-alanina en 200 partes de cloruro de metileno. El disolvente se separa entonces por evaporación bajo presión

reducida y el residuo se somete a una cromatografía en columna a baja presión. El éster bencílico de N-t-butoxicarbonilglicil-L-alanina puro resultante se disuelve en 60 partes de dioxano y se trata con un exceso de 10 veces de ácido clorhídrico 2N en dioxano, con agitación, durante 15 minutos. El disolvente se separa de nuevo por evaporación bajo presión reducida y el residuo se tritura con éter para proporcionar el hidrocioruro de éster bencílico de glicil-L-alanina, representado por la fórmula:



El empleo de una cantidad equivalente de éster bencílico de sarcosina y éster bencílico de ácido α -aminoisobutírico en lugar del éster bencílico de L-alanina, en el procedimiento antes detallado, proporciona los siguientes compuestos:

15 Hidrocioruro de éster bencílico de glicilsarcosina de fórmula: $\text{H-Gly-Sar-OBzl}\cdot\text{HCl}$ e

Hidrocioruro de éster bencílico de ácido glicil- α -aminoisobutírico, representado por la fórmula:

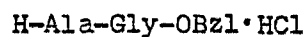


EJEMPLO 3

En 200 partes de cloruro de metileno se disuelven 19,3 partes de éter de 2,4,5-triclorofenilo de N-t-butoxicarbonil-L-alanina y 9,7 partes de éster bencílico de glicina y la solución resultante se agita durante la noche a temperatura ambiente. La separación de los disolventes bajo presión reducida proporciona el éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-alanilglicina en bruto el cual se purifica por cromatografía en columna a baja presión. El dipéptido bloqueado purificado se disuelve entonces en 50 partes de dioxano y se agita con un

exceso de 10 veces de ácido clorhídrico 2N en dioxano durante 15 minutos. El disolvente se separa por evaporación bajo presión reducida para dar, después de la trituration con éter, el hidrocioruro de éster bencílico de L-alanilglicina.

5 Este compuesto se representa por la siguiente fórmula:
la:



10 El empleo de una cantidad equivalente de éster de 2,4,5-triclorofenilo de N-p-butoxicarbonilsarcosina y éster de 2,4,5-triclorofenilo de ácido N-t-butoxicarbonil- α -aminoisobutírico, en lugar del éster de 2,4,5-triclorofenilo de N-t-butoxicarbonil-L-alanina, y la repetición sustancial del procedimiento anteriormente detallado, proporciona los siguientes compuestos:

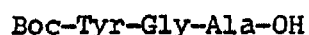
15 Hidrocioruro de éster bencílico de sarcosilglicina de fórmula: $\text{H-Sar-Gly-OBzl}\cdot\text{HCl}$ e

Hidrocioruro de éster bencílico de α -aminoisobutirilglicina de fórmula $\text{H-Aib-Gly-OBzl}\cdot\text{HCl}$.

EJEMPLO 4

20 Se agita durante 16 horas, a temperatura ambiente, una solución de 17,6 partes de éster de 2,4,5-triclorofenilo de N-t-butoxicarbonil-L-pirosina, 9 partes de hidrocioruro de éster bencílico de glicil-L-alanina y 1,2 partes de N-metil-morfolina en 200 partes de cloruro de metileno. La separación
25 del disolvente bajo presión reducida proporciona un producto en bruto que se purifica por cromatografía en columna a baja presión para dar éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina. El material purificado se disuelve en 400 partes de metanol. A continuación, se añaden 0,4 partes
30 de catalizador metálico de negro de paladio y la mezcla se sa-

5 cude con hidrógeno a presión atmosférica y temperatura ambiente durante 5 horas aproximadamente. El catalizador se separa por filtración y el disolvente se elimina por evaporación bajo presión reducida. El material resultante se purifica por cromatografía de baja presión para dar N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina. El compuesto se representa por la siguiente fórmula:



10 El empleo de una cantidad equivalente de hidrocloreuro de éster bencílico de glicilsarcosina, hidrocloreuro de éster bencílico de L-alanilglicilo, hidrocloreuro de éster bencílico de sarcosilglicilo, hidrocloreuro de éster bencílico de ácido glicil- α -aminoisobutírico e hidrocloreuro de éster bencílico de α -aminoisobutirilglicina, en lugar del hidrocloreuro de
15 éster bencílico de glicil-L-alanina, y la repetición sustancial del procedimiento anteriormente detallado, proporciona los siguientes compuestos:

 N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicilsarcosina, representada por la fórmula Boc-Tyr-Gly-Sar-OH;

20 N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-L-alanilglicina, representada por la fórmula Boc-Tyr-Ala-Gly-OH;

 N-t-butoxicarbonil-L-tirosilsarcosilglicina, representada por la fórmula Boc-Tyr-Sar-Gly-OH;

25 Acido N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil- α -aminoisobutírico, representado por la fórmula Boc-Tyr-Gly-Aib-OH;

y

 N-t-butoxicarbonil-L-tirosil- α -aminoisobutirilglicina, representada por la fórmula Boc-Tyr-Aib-Gly-OH.

EJEMPLO 5

30 Se suspenden 11,7 partes de ácido 5-aminopentanóico

y 22,8 partes de monohidrato de ácido p-toluenosulfónico en 180 partes de benceno y se añaden 32,4 partes de alcohol bencílico. Se acopla un separador de agua continuo al matrás y la mezcla se agita a la temperatura de fuerte reflujo durante 16 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se separa bajo presión reducida y el aceite residual se sacude con n-hexano. La parte sobrenadante se desecha y el producto gomoso se frota con éter etílico haciendo que tenga lugar la cristalización. El sólido se separa por filtración y se lava con éter para proporcionar el p-toluenosulfonato de éster bencílico de ácido 5-aminopentanóico.

La repetición del procedimiento detallado en el párrafo anterior, utilizando una cantidad equivalente de ácido 6-aminohexanóico, ácido p-aminobenzóico y ácido 4-aminociclohexanocarboxílico en lugar de ácido 5-aminopentanóico, proporciona los siguientes compuestos:

p-toluenosulfonato de éster bencílico de ácido 6-aminohexanóico, p-toluenosulfonato de éster bencílico de ácido p-aminobenzóico, y p-toluenosulfonato de éster bencílico de ácido 4-aminociclohexanocarboxílico.

EJEMPLO 6

Empleando una cantidad equivalente de p-toluenosulfonato de éster bencílico de ácido 5-aminopentanóico, p-toluenosulfonato de éster bencílico de ácido 6-aminohexanóico, p-toluenosulfonato de éster bencílico de ácido p-aminobenzóico, p-toluenosulfonato de éster bencílico de ácido 4-aminociclohexanocarboxílico, en lugar del hidrocloreuro de éster bencílico de glicil-L-alanina del ejemplo 4, y repitiendo sustancialmente el procedimiento allí detallado, se obtienen los siguientes compuestos:

Acido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-5-aminopentanóico,
Acido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-6-aminohexanóico,
Acido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-p-aminobenzóico, y
Acido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-4-aminociclohexano-
5 carboxílico.

EJEMPLO 7

En 200 partes de dimetilformamida se disuelven 14
partes de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina y 3,5
partes de N-metilmorfolina y se enfría a -15°C. A continuación,
10 se añaden en gotas 5,2 partes de cloroformato de isobutilo en
un periodo de 30 minutos, mientras se mantiene la temperatura
en -15°C. A continuación, se añade lentamente a -15°C una so-
lución de 9,8 partes de éster bencílico de L-fenilalanil-L-
leucina en 50 partes de dimetilformamida y la mezcla se agita
15 a esta temperatura durante 30 minutos. El aparato de enfriamien-
to se retira y la mezcla se agita a temperatura ambiente duran-
te 2 horas más. El producto se aísla diluyendo la mezcla de
reacción con 10 partes en volumen de agua y extractando con
acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo se combi-
20 nan, se secan sobre sulfato sódico anhidro y se separan hasta
sequedad bajo presión reducida. La purificación del residuo
por cromatografía en columna a baja presión proporciona el
éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-ala-
nil-L-fenilalanil-L-leucina, representado por la fórmula
25 Boc-Tyr-Gly-Ala-Phe-Leu-OBzl.

Cuando se utiliza una cantidad equivalente del tri-
péptido adecuado N-t-butoxicarbonil-prottegido, en lugar de
la N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina empleada en el
párrafo anterior, y cuando se repite practicamente el procedi-
30 miento allí detallado, se obtienen los siguientes compuestos:

Ester bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicilsarcosil-L-fenilalanil-L-leucina, representado por la fórmula Boc-Tyr-Gly-Sar-Phe-Leu-OBzl;

5 Ester bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-L-alanilglicil-L-fenilalanil-L-leucina, representado por la fórmula Boc-Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-OBzl;

Ester bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilsarcosilglicil-L-fenilalanil-L-leucina, representado por la fórmula Boc-Tyr-Sar-Gly-Phe-Leu-OBzl.

10 EJEMPLO 8

Quando se utiliza una cantidad equivalente de éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina en lugar del éster bencílico de L-fenilalanil-L-leucina del ejemplo 7 y se repite el procedimiento allí detallado practicamente, se obtiene
15 éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanil-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula:
Boc-Tyr-Gly-Ala-Phe-Met-OBzl.

EJEMPLO 9

20 Quando se utilizan cantidades equivalentes de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicilsarcosina y éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina, en lugar de la N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina y éster bencílico de L-fenilalanil-L-leucina respectivamente, del ejemplo 7, y cuando se repite el procedimiento allí detallado practicamente, se obtiene
25 éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicilsarcosil-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula: Boc-Tyr-Gly-Sar-Phe-Met-OBzl.

EJEMPLO 10

30 Cuando se hacen reaccionar cantidades equivalentes de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-L-alanilglicina y éster ben-

cílico de L-fenilalanil-L-metionina, según el procedimiento detallado en el ejemplo 7, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-L-alanilglicil-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula Boc-Tyr-Ala-Gly-Phe-Met-OBzl.

EJEMPLO 11

Quando se hacen reaccionar cantidades equivalentes de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilsarcosilglicina y éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina, según el procedimiento del ejemplo 7, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilsarcosilglicil-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula Boc-Tyr-Sar-Gly-Phe-Met-OBzl.

EJEMPLO 12

Quando se emplea una cantidad equivalente de ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-5-aminopentanóico en lugar de la N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina del ejemplo 7 y cuando se repite el procedimiento allí detallado, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-5-aminopentanoil-L-fenilalanil-L-leucina, representado por la fórmula Boc-Tyr-HN-(CH₂)₄CO-Phe-Leu-OBzl.

EJEMPLO 13

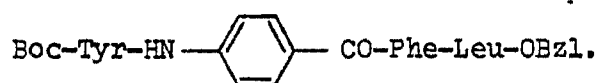
Quando se utiliza una cantidad equivalente de ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-6-aminohexanóico en lugar de la N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-L-alanina del ejemplo 7 y se repite el procedimiento allí detallado practicamente, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-6-aminohexanoil-L-fenilalanil-L-leucina, representado por la fórmula Boc-Tyr-HN-(CH₂)₅CO-Phe-Leu-OBzl.

EJEMPLO 14

Quando se emplea una cantidad equivalente de ácido

N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-p-aminobenzóico en lugar de la N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina del ejemplo 7 y se repite practicamente el procedimiento allí detallado, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-p-aminobenzoil-L-fenilalanil-L-leucina, representado por la fórmula

5



EJEMPLO 15

Cuando se hacen reaccionar cantidades equivalentes de ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-5-aminopentanóico y éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina según el procedimiento del ejemplo 7, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-5-aminopentanoil-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula Boc-Tyr-HN-(CH₂)₄-CO-Phe-Met-OBzl.

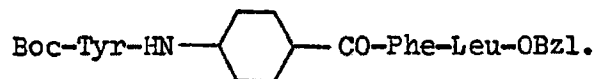
10

EJEMPLO 16

Cuando se emplea una cantidad equivalente de ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-4-aminociclohexanocarboxílico en lugar de la N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-L-alanina del ejemplo 7 y cuando se repite el procedimiento allí detallado practicamente, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-4-aminociclohexanocarboxil-L-fenilalanil-L-leucina, representado por la fórmula

15

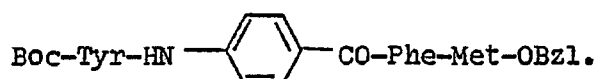
20



EJEMPLO 17

Cuando se hacen reaccionar cantidades equivalentes de ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-p-aminobenzóico y éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina, según el procedimiento del ejemplo 7, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-p-aminobenzoil-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula

25

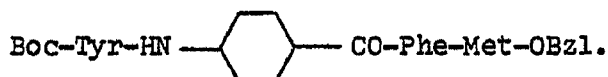


EJEMPLO 18

5 Cuando se hacen reaccionar cantidades equivalentes de ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-6-aminohexanóico y éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina, según el procedimiento del ejemplo 7, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-6-aminohexanoil-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula $\text{Boc-Tyr-HN}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO-Phe-Met-OBzl}$.

EJEMPLO 19

10 Cuando se hacen reaccionar cantidades equivalentes de ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-4-aminociclohexanocarboxílico y éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina, según el procedimiento del ejemplo 7, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-4-aminociclohexanocarbonil-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula



EJEMPLO 20

20 Cuando se emplean cantidades equivalentes de N-t-butoxicarbonil-D-tirosilglicil-D-alanina y éster bencílico de D-fenilalanil-D-leucina en lugar de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina y éster bencílico de L-fenilalanil-L-leucina, respectivamente, del ejemplo 7, y cuando se repite prácticamente el procedimiento allí detallado, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-D-tirosilglicil-D-alanil-D-fenilalanil-D-leucina, representado por la fórmula $\text{Boc-Tyr-Gly-Ala-Phe-Leu-Obzl}$ (D-D-D-D).

EJEMPLO 21

30 Cuando se emplean cantidades equivalentes de N-t-butoxicarbonil-DL-tirosilglicil-DL-alanina y éster bencílico de DL-fenilalanil-DL-leucina en lugar de N-t-butoxicarbonil-L-

5 tirosilglicil-L-alanina y éster bencílico de L-fenilalanil-L-leucina, respectivamente, del ejemplo 7, y cuando se repite practicamente el procedimiento allí detallado, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-DL-tirosilglicil-DL-alanil-DL-fenilalanil-DL-leucina, representado por la fórmula Boc-Tyr-Gly-Ala-Phe-Leu-OBzl (DL-DL-DL-DL).

EJEMPLO 22

10 Cuando se emplea una cantidad equivalente de ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil- α -aminoisobutírico o N-t-butoxicarbonil-L-tirosil- α -aminoisobutirilglicina en lugar de la N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina del ejemplo 7, y cuando se repite practicamente el procedimiento allí detallado, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil- α -aminoisobutiril-L-fenilalanil-L-leucina o éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil- α -aminoisobutirilglicil-L-fenilalanil-L-leucina, respectivamente. Estos compuestos están representados por las fórmulas Boc-Tyr-Gly-Aib-Phe-Leu-OBzl y Boc-Tyr-Aib-Gly-Phe-Leu-OBzl, respectivamente.

EJEMPLO 23

20 Cuando se emplean cantidades equivalentes de ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil- α -aminoisobutírico y éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina, en lugar de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina, y éster bencílico de L-fenilalanina-L-leucina, respectivamente, del ejemplo 7, y cuando se repite practicamente el procedimiento allí detallado, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil- α -aminoisobutiril-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula Boc-Tyr-Gly-Aib-Phe-Met-OBzl.

EJEMPLO 24

30 Cuando se emplean cantidades equivalentes de N-t-bu-

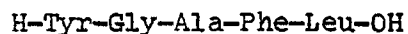
toxicarbonil-L-tirosil- α -aminoisobutirilglicina y éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina, en lugar de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanina y éster bencílico de L-fenilalanina-L-leucina, respectivamente, del ejemplo 7, y cuando se repite prácticamente el procedimiento allí detallado, se obtiene éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosil- α -aminoisobutirilglicil-L-fenilalanil-L-metionina, representado por la fórmula Boc-Tyr-Aib-Gly-Phe-Met-OBzl.

EJEMPLO 25

Se disuelven 18,9 partes de éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanil-L-fenilalanil-L-leucina en 70 partes de metanol y la solución se enfría a 10°C. A continuación se añaden por gotas 90 partes en volumen de una solución de hidróxido sódico 1 N, con agitación, mientras se mantiene a la temperatura por debajo de 20°C. Después de reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, se separa el metanol por evaporación bajo presión reducida. La solución se lava una vez con éter para separar alcohol bencílico y la capa acuosa se acidifica con 90 partes en volumen de una solución de ácido clorhídrico 1N. El sólido resultante se filtra y se lava con agua para proporcionar N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanil-L-fenilalanil-L-leucina.

Se disuelve la N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanil-L-fenilalanil-L-leucina en 100 partes de dioxano y se agita con un exceso de 10 veces de ácido clorhídrico 2N en dioxano, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. El disolvente se separa entonces bajo presión reducida y el residuo se tritura con éter. El sólido resultante se precipita de la mezcla de metanol y éter para proporcionar hidrocloreuro de L-tirosilglicil-L-alanil-L-fenilalanil-L-leucina.

El hidrocioruro de L-tirosilglicil-L-alanil-L-fenilalanil-L-leucina se disuelve en 250 partes en volúmen de ácido acético al 20 % y se pasa lentamente a través de una columna intercambiadora de iones IR-45 en la forma acetato. La columna se lava con ácido acético al 20 % hasta que no se eluye más péptido. Las fracciones que contienen producto se combinan y el disolvente se separa por separación bajo presión reducida a temperatura ambiente. El cristal residual se disuelve en 75 partes de agua y se liofiliza para dar L-tirosilglicil-L-alanil-L-fenilalanil-L-leucina como un sólido esponjoso. Este compuesto está representado por la siguiente fórmula:



Este compuesto se caracteriza por la siguiente relación de aminoácidos en el hidrolisato ácido: Tyr 1,03, Gly 0,95, Ala 0,99, Phe 0,98 y Leu 0,97.

Quando se utiliza una cantidad equivalente de éster bencílico de péptido N-t-butoxicarbonil-prottegido en lugar del éster bencílico de N-t-butoxicarbonil-L-tirosilglicil-L-alanil-L-fenilalanil-L-leucina, del primer párrafo de este ejemplo, y cuando se repite practicamente el procedimiento allí detallado, se obtienen los siguientes compuestos:

L-tirosilglicilsarcosil-L-fenilalanil-L-leucina, representada por la fórmula H-Tyr-Gly-Sar-Phe-Leu-OH y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el hidrolisato ácido: Tyr 1,03, Gly 0,90, Sar 1,03, Phe 0,99 y Leu 0,90;

L-tirosil-L-alanilglicil-L-fenilalanil-L-leucina, representada por la fórmula H-Tyr-Ala-Gly-Phe-Leu-OH y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el hidrolisato ácido: Tyr 1,05, Ala 1,06, Gly 0,95, Phe 1,00 y Leu 1,09;

5 L-tirosilsarcosilglicil-L-fenilalanil-L-leucina,
representada por la fórmula H-Tyr-Sar-Gly-Phe-Leu-OH y
caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el
hidrolisato ácido: Tyr 1,01, Sar 0,97, Gly 1,04, Phe 1,09 y
Leu 1,02;

10 L-tirosilflicil-L-alanil-L-fenilalanil-L-metionina,
representada por la fórmula H-Tyr-Gly-Ala-Phe-Met-OH y
caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el
hidrolisato ácido: Tyr 0,99, Gly 1,00, Ala 0,94, Phe 1,00 y
Met 0,95;

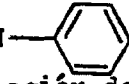
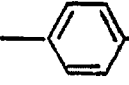
15 L-tirosilglicilsarcosil-L-fenilalanil-L-metionina,
representada por la fórmula H-Tyr-Gly-Sar-Phe-Met-OH y
caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el
hidrolisato ácido: Tyr 1,08, Gly 1,09, Sar 1,03, Phe 1,02 y
Met 0,99;

20 L-tirosil-L-alanilglicil-L-fenilalanil-L-metionina,
representada por la fórmula H-Tyr-Ala-Gly-Phe-Met-OH y
caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el
hidrolisato ácido: Tyr 1,04, Ala 1,07, Gly 1,00, Phe 1,03 y
Met 1,07;

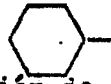

25 L-tirosilsarcosilglicil-L-fenilalanil-L-metionina,
representada por la fórmula H-Tyr-Sar-Gly-Phe-Met-OH y
caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el
hidrolisato ácido: Tyr 0,91, Sar 1,03, Gly 1,06, Phe 1,04 y
Met 1,00;



30 L-tirosil-5-aminopentanoil-L-fenilalanil-L-leucina,
representada por la fórmula H-Tyr-HN-(CH₂)₄-CO-Phe-Leu-OH y
caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el
hidrolisato ácido: Tyr 1,02, HN-(CH₂)₄-CO- 1,01, Phe 0,96 y
Leu 1,02;

L-tirosil-6-aminohexanoil-L-fenilalanil-L-leucina,
representada por la fórmula $H-Tyr-HN-(CH_2)_5-CO-Phe-Leu-OH$ y
caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el
hidrolisato ácido: Tyr 1,03, $-HN-(CH_2)_5-CO-$ 1,02, Phe 1,03 y
Leu 0,90;

L-tirosil-p-aminobenzoil-L-fenilalanil-L-leucina,
representada por la fórmula $H-Tyr-HN-$  $-CO-Phe-Leu-OH$
y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en
el hidrolisato ácido: Tyr 0,98, $-HN-$  $-CO-$ 0,91,
Phe 1,00 y Leu 0,94;

L-tirosil-5-aminopentanoil-L-fenilalanil-L-metio-
nina, representada por la fórmula $H-Tyr-HN-(CH_2)_4-CO-Phe-Met-OH$
y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en
el hidrolisato ácido: Tyr 1,00, $-HN-(CH_2)_4-CO-$ 0,92, Phe 1,00
y Met 0,93;

L-tirosil-4-aminociclohexano carbonil-L-fenilala-
nil-L-leucina, representada por la fórmula $H-Tyr-HN-$  $-$
 $CO-Phe-Leu-OH$ y caracterizada por la siguiente relación de
aminoácidos en el hidrolisato ácido: Tyr 1,04, $-HN-$  $-CO-$
0,93, Phe 0,97 y Leu 1,04;

L-tirosil-p-aminobenzoil-L-fenilalanil-L-metionina,
representada por la fórmula $H-Tyr-HN-$  $-CO-Phe-Met-OH$
y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en
el hidrolisato ácido: Tyr 1,05, $-HN-$  $-CO-$ 0,98, Phe 1,10 y
Met 0,91;

L-tirosil-6-aminohexanoil-L-fenilalanil-L-metionina,
representada por la fórmula $H-Tyr-HN-(CH_2)_5-CO-Phe-Met-OH$ y
caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en
el hidrolisato ácido: Tyr 0,97; $-HN-(CH_2)_5-CO-$ 0,92, Phe 1,03
y Met 1,00;

L-tirosil-4-aminociclohexanocarbonil-L-fenilalanil-L-metionina, representada por la fórmula $H-Tyr-HN-\text{C}_6\text{H}_{10}-CO$ Phe-Met-OH y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el hidrolisato ácido: Tyr 1,01, $-HN-\text{C}_6\text{H}_{10}-CO-1,00$, Phe 1,04 y Met 0,93;

D-tirosilglicil-D-alanil-D-fenilalanil-D-leucina, representada por la fórmula H-Tyr-Gly-Ala-Phe-Leu-OH (D-D-D-D);

DL-tirosilglicil-DL-alanil-DL-fenilalanil-DL-leucina, representada por la fórmula H-Tyr-Gly-Ala-Phe-Leu-OH (DL-DL-DL-DL);

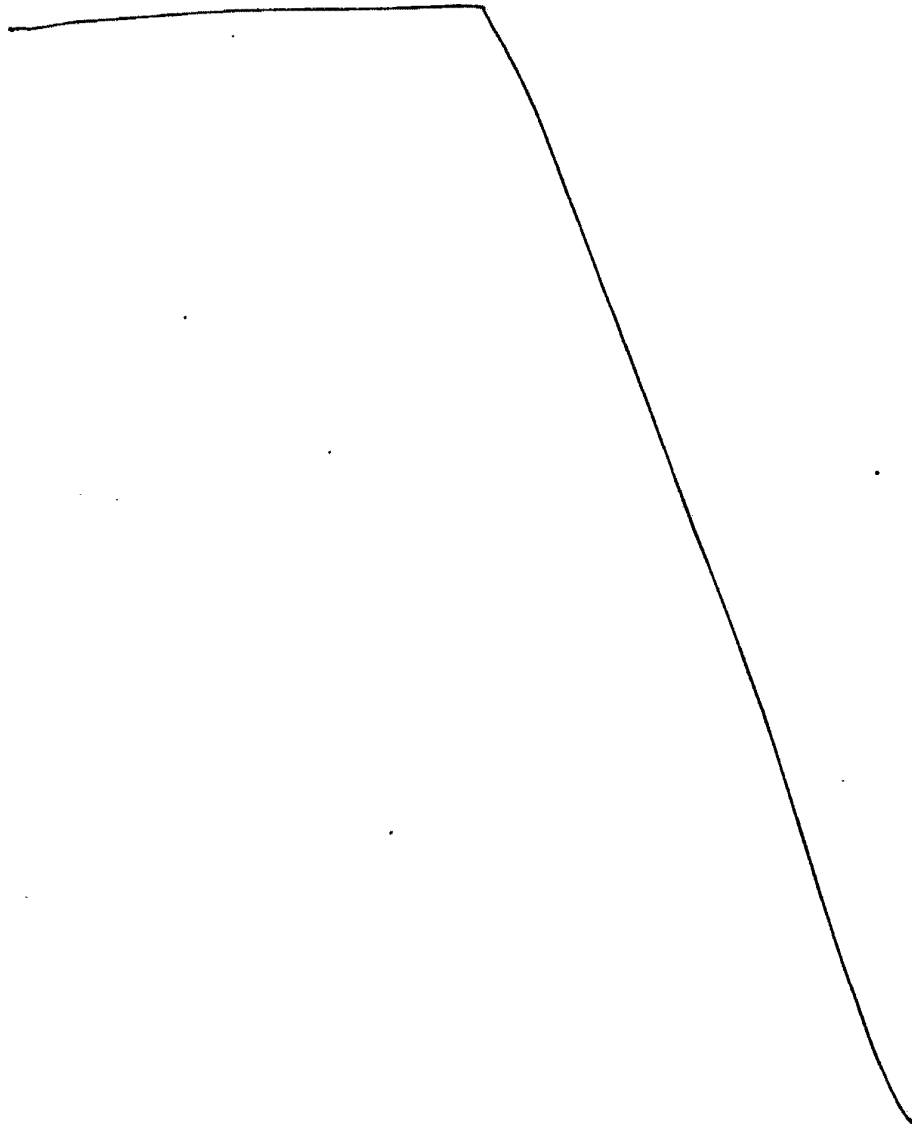
L-tirosilglicil- α -aminoisobutiril-L-fenilalanil-L-leucina, representada por la fórmula H-Tyr-Gly-Aib-Phe-Leu-OH y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el hidrolisato ácido: Tyr 1,08, Gly 0,98, Aib 1,03, Phe 0,94 y Leu 1,01;

L-tirosil- α -aminoisobutirilglicil-L-fenilalanil-L-leucina, representada por la fórmula H-Tyr-Aib-Gly-Phe-Leu-OH y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el hidrolisato ácido: Tyr 0,96, Aib 1,09, Gly 1,05, Phe 1,10 y Leu 1,00;

L-tirosilglicil- α -aminoisobutiril-L-fenilalanil-L-metionina, representada por la fórmula H-Tyr-Gly-Aib-Phe-Met-OH y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el hidrolisato ácido: Tyr 1,03, Gly 1,09, Aib 1,06, Phe 1,00 y Met 1,06; y

L-tirosil- α -aminoisobutirilglicil-L-fenilalanil-L-metionina, representada por la fórmula H-Tyr-Aib-Gly-Phe-Met-OH y caracterizada por la siguiente relación de aminoácidos en el hidrolisato ácido: Tyr 1,08, Aib 1,05, Gly 1,05, Phe 0,99 y Met 1,00.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.



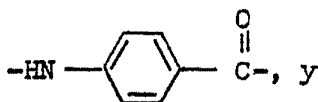
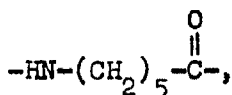
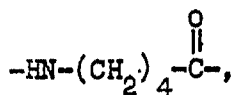
REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para preparar encefalinas 2- y 3-sustituídas, de fórmula:

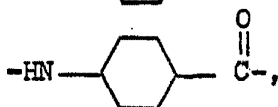


5 en la que Y es Leu ó Met; W se elige del grupo consistente en

- Aib-Gly-,
- Ala-Gly-,
- Sar-Gly-,
- Gly-Aib-,
- 10 -Gly-Ala-,
- Gly-Sar-,



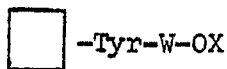
15



20 y la configuración estereoquímica de cada uno de los residuos aminoácidos ópticamente activos es D, L ó DL; caracterizado porque comprende someter a reacción de acoplamiento a un di péptido C-terminal, opcionalmente sustituido con grupos protectores, de fórmula:



en la que Y se define como anteriormente, con un éster activo N-protégido de fórmula:



Handwritten signature

en la que W se define como anteriormente, es un grupo

N-protector, en un disolvente orgánico adecuado, en presencia de una base orgánica, seguido por la separación de los grupos protectores.

5 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los residuos aminoácidos tienen la configuración estereoquímica L.

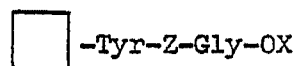
3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para la preparación de un compuesto de fórmula:



10 en la que Z es Aib, Ala ó Sar; Y es Leu ó Met; y la configuración estereoquímica de cada uno de los residuos aminoácidos ópticamente activos es L, se acopla un dipéptido C-terminal, opcionalmente sustituido con grupos protectores, de fórmula:

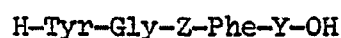


15 en la que Y se define como anteriormente, con un éster activo N-protégido de fórmula:




20 en la que \square es un grupo N-protector; X es un grupo éster activo; y Z se define como anteriormente; en un disolvente orgánico adecuado, en presencia de una base orgánica, seguido por la separación de los grupos protectores.

4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para la preparación de un compuesto de fórmula



25 en la que Z es Aib, Ala ó Sar; Y es Leu ó Met; y la configuración estereoquímica de cada uno de los residuos aminoácidos ópticamente activos es L, se acopla un dipéptido C-terminal,

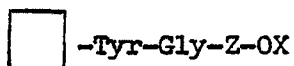


opcionalmente sustituido con grupos protectores, de fórmula:



en la que Y se define como anteriormente, con un éster activo N-prottegido de fórmula:

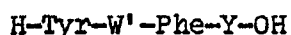
5



en la que \square es un grupo N-protector, X es un grupo éster activo y Z se define como anteriormente, en un disolvente orgánico adecuado, en presencia de una base orgánica, seguido por la separación de los grupos protectores.

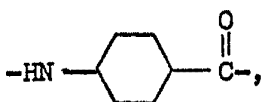
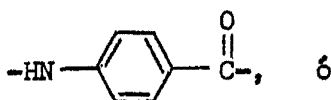
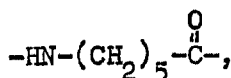
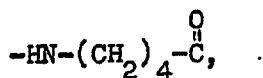
10

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para la preparación de un compuesto de fórmula:



en la que Y es Leu ó Met; W' es:

15

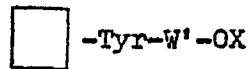


20

y la configuración estereoquímica de cada uno de los residuos aminoácidos opticamente activos es L, se acopla un dipéptido C-terminal, opcionalmente sustituido con grupos protectores, de fórmula:



~~AA~~ en la que Y se define como anteriormente, con un éster activo N-prottegido de fórmula:



5 en la que \square es un grupo N-protector, X es un grupo éster activo y W' se define como anteriormente, en un disolvente orgánico adecuado, en presencia de una base orgánica, seguido por la separación de los grupos protectores.

10 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se acopla ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-5-aminopentanóico con éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina en dimetilformamida, en presencia de N-metilmorfolina, seguido por la separación de los grupos protectores.

15 7.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se acopla ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-4-aminociclohexanocarboxílico con éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina en dimetilformamida, en presencia de N-metilmorfolina, seguido por la separación de los grupos protectores.

20 8.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se acopla ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-p-aminobenzóico con éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina en dimetilformamida, en presencia de N-metilmorfolina, seguido por la separación de los grupos protectores.

25 9.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se acopla ácido N-t-butoxicarbonil-L-tirosil-6-aminohexanóico con éster bencílico de L-fenilalanil-L-metionina, en dimetilformamida, en presencia de N-metilmorfolina, seguido por la separación de los grupos protectores.

10.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se acopla N-t-butoxicarbonil-L-tirosil- α -aminoisobutilglicina con éster bencílico de L-fenilalanil-L-metio

AA

nina en dimetilformamida, en presencia de N-metilmorfolina, seguido por la separación de los grupos protectores.

11.- Procedimiento para preparar encefalinas 2- y 3-sustituídas, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

5

Esta Memoria consta de 31 hojas escritas a máquina por una sola cara.

- 5 MAY 1977

Madrid,

G.D. SEARLE & CO.

