

20 JUL. 1978



ESPAÑA

| | | | |
|-------|----------|----------------------------------|-------|
| 19 ES | 11 21 | NUMERO -458691 | 10 A1 |
| | 22 | FECHA DE PRESENTACION 11-5-77 | |

PATENTE DE INVENCION

| | | |
|------------------------|---------------------|------------|
| 30 PRIORIDADES: | 32 FECHA | 33 PAIS |
| 31 NUMERO 19.327/76 | 11 de mayo de 1.976 | Inglaterra |

| | | |
|------------------------|---|--------------------------------------|
| 47 FECHA DE PUBLICIDAD | 51 CLASIFICACION INTERNACIONAL C02C/A61K | 62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
|------------------------|---|--------------------------------------|

| |
|--|
| 64 TITULO DE LA INVENCION PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR POLIPEPTIDOS. |
|--|

| |
|---|
| 71 SOLICITANTE (S) IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED. |
|---|

| |
|---|
| DOMICILIO DEL SOLICITANTE Imperial Chemical House, Millbank, Londres SW1P 3JF, Inglaterra. |
|---|

| |
|--|
| 72 INVENTOR (ES) Anand Swaroop Dutta, Barrington John Albert Furr, Michael Brian Giles. |
|--|

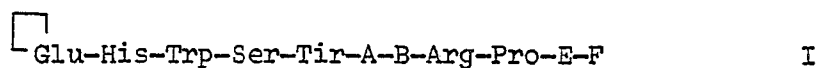
| |
|-----------------|
| 73 TITULAR (ES) |
|-----------------|

| |
|---------------------------------|
| 74 REPRESENTANTE GOMEZ-ACEBO |
|---------------------------------|

Esta invención se relaciona con un procedimiento para preparar un polipéptido que posee propiedades agonistas de luliberina, siendo la luliberina el nombre trivial internacionalmente aprobado para LH-RF (factor de liberación de hormona luteinizante) (J. Biol. Chem., 1975, 250, 3215).

Es sabido (Dutta, Furr, Giles y Morley, Clinical Endocrinology, 1976, 5, Suplemento, p. 291s-298s) que la sustitución de α -aza-amino-ácidos en las posiciones 6 ó 10 de luliberina produce compuestos que son menos potentes que la molécula principal en su capacidad para liberar hormona luteinizante (LH) de la glándula pituitaria. Se ha encontrado ahora que la sustitución de azaglicina en la posición 10 en combinación con la sustitución de varios D- α -amino-ácidos en la posición 6 de luliberina o la sustitución de azaglicina o azalanina en la posición 6 en combinación con el reemplazamiento de la amida glicínica terminal por un radical etilamino en la luliberina, produce compuestos que son más activos que la luliberina en su capacidad para liberar hormona luteinizante.

De acuerdo con la invención se proporciona un polipéptido de fórmula:



en la que A es D-Tyr, D-Tir(Me), D-Ser, D-Ser(Bu^t), D-Fe, D-Ala ó D-Trp, B es Leu ó MeLeu, E es Azgli y F es un radical amino, o A es Azgly ó Azala, B es Leu, E es un enlace directo y F es un radical etilamino; y sus sales de adición de ácido farmacéutica y veterinariamente aceptables.

En la fórmula I anterior y en toda esta memoria, los residuos amino-ácidos son designados por sus abreviaturas convencionales (Pure and Applied Chemistry, 1974, 40,

317-331). Un residuo α -aza-amino-ácido es aquel en el cual el α -CH de un aminoácido ha sido reemplazado por nitrógeno. La abreviatura para un α -aza-aminoácido se deriva de aquella del correspondiente aminoácido insertando el prefijo "Az". De este modo, Azgly representa aza-glicina y Azala representa azalanina. Cuando no se designa la configuración de un aminoácido particular, dicho aminoácido (además de los α -aza-aminoácidos que no contienen ningún centro asimétrico adyacente al grupo carboxi) tiene la configuración L natural.

Grupos particulares de compuestos dentro de los compuestos de la invención son los siguientes:

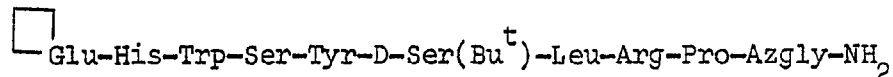
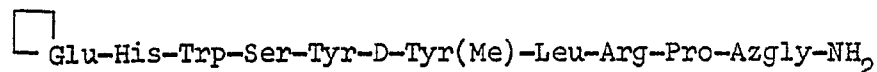
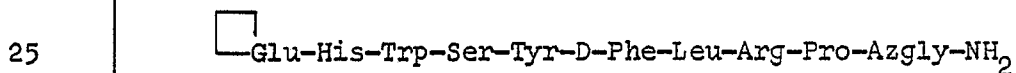
Aquellos en donde A es D-Tye, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu^t), D-Phe, D-Ala ó D-Trp, B es Leu ó MeLeu, E es Azgly y F es un radical amino.

Aquellos en donde A es Azgly ó Azala, B es Leu, E es un enlace directo y F es un radical etilamino.

Aquellos en donde A es D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu^t), D-Phe, D-Ala ó D-Trp, B es Leu ó MeLeu, E es Azgly y F es un radical amino.

Un grupo preferido de compuestos de la invención es aquel en donde A es D-Tyr(Me), D-Ser(Bu^t) ó D-Phe, B es Leu ó MeLeu, E es Azgly y F es un radical amino.

Los tres compuestos preferidos de la invención tienen las siguientes estructuras:



Una sal de adición de ácido particular, farmacéutica o veterinariamente aceptable, de la invención es, por ejemplo, un hidrocloruro, fosfato, citrato o acetato.

El polipéptido de la invención se puede preparar por métodos conocidos para la producción de compuestos químicamente análogos. Así, y como características de la invención, se proporcionan los siguientes procesos, A, B, E y F que tienen los significados establecidos anteriormente:

(a) La separación de uno o más grupos protectores de péptidos convencionales de un polipéptido protegido, para dar el compuesto de fórmula I;

(b) La reacción de \square Glu-OH, \square Glu-His-OH, \square Glu-His-Trp-OH, \square Glu-His-Trp-Ser-OH, \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH, \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-OH, \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-OH, \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-OH

ó \square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-OH, o un derivado activado adecuado de cualquiera de los anteriores, con

H-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F,

H-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F,

H-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-A-B-Arg-Pro-E-F,

H-B-Arg-Pro-E-F, H-Arg-Pro-E-F, H-Pro-E-F ó H-Azgly-NH₂,

respectivamente, o un derivado activado adecuado de cualquiera de éstos, en una reacción de acoplamiento de péptidos convencional; o

(c) La reacción de un ácido carboxílico de fórmula:

\square Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-OH II

o un derivado activado del mismo, con amoníaco o etilamina.

En el procedimiento (a) pueden existir tantos grupos protectores en el material de partida como radicales requieran protección, por ejemplo algunos o todos aquellos radicales que existen en el producto como radicales OH libres o radicales NH básicos.

En el proceso (a) el grupo o grupos protectores pueden ser aquellos descritos en un libro de texto convencional sobre química de péptidos, por ejemplo M. Bodansky y M. A. Ondetti, "Peptide Synthesis", Interscience, New York, 1966, Capítulo IV; F. M. Finn y K. Hofmann, "The Proteins", Vol. II, editado por H. Neurath y R.L. Hill, Academic Press Inc., New York, 1976, p. 106; "Amino-ácids, Peptides and Proteins" (Specialist Periodical Reports), The Chemical Society, Londres, volúmenes 1 a 8. En estos libros se describen también varios métodos para la separación de los grupos protectores.

En el procedimiento (a) un grupo NH-protector particularmente útil es el radical benciloxicarbonilo y un grupo OH-protector particularmente útil es el radical bencilo. Ambos grupos pueden separarse fácilmente por hidrogenolisis, por ejemplo en presencia de un catalizador de paladio sobre carbón vegetal.

En el proceso (a) un grupo NH-protector particularmente útil adicional es el radical t-butoxicarbonilo y otro grupo OH-protector particularmente útil es el radical t-butilo. Ambos grupos se pueden separar fácilmente por tratamiento con un ácido tal como cloruro de hidrógeno o ácido trifluoroacético.

En el proceso (a) otro grupo NH-protector particularmente útil es el radical benciloxicarbonilo o t-butoxicarbonilo y otro grupo OH-protector particularmente útil es

el radical t-butilo. Estos grupos protectores se pueden separar facilmente por tratamiento con HBr en ácido acético.

5 En el proceso (b) puede emplearse cualquiera de las reacciones de acoplamiento de péptidos convencionales, por ejemplo las descritas en un libro convencional sobre química de péptidos, por ejemplo el citado libro de Bodansky y Ondetti, Capítulo V, y los volúmenes anteriores 1 a 8 de Specialist Periodical Reports of the Chemical Society.

10 En el proceso (b) una reacción de acoplamiento particular es un acoplamiento de azida, un acoplamiento de éster activo o un acoplamiento que implica N,N'-díciclohexilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol. Una reacción de acoplamiento preferida es la de acoplamiento de azida y en particular aquel acoplamiento que forma el enlace péptido
15 His-Trp ó Ser-Tyr.

En el proceso (b) un derivado activado adecuado del material de partida es, por ejemplo, un éster o anhídrido. En el caso de un derivado activado, la reacción se puede efectuar poniendo en contacto el derivado activado con amoniaco
20 o etilamina en presencia de un diluyente o disolvente. En aquellos casos en donde el material de partida es el ácido libre de fórmula II, la reacción con amoniaco o etilamina se lleva a cabo convenientemente mediante una reacción de acoplamiento convencional de péptidos tal como N,N'-díciclohexilcarbodiimida.
25

Los materiales de partida para utilizarse en los procesos de la invención se pueden preparar, a partir de compuestos conocidos, mediante reacciones de acoplamiento convencional de péptidos, reacciones convencionales para la protección de péptidos y reacciones convencionales para la despro-
30

tección de péptidos que son bien conocidas para los expertos en la técnica, por ejemplo como se establece en los ejemplos 1 a 10.

5 Como anteriormente se ha indicado, el compuesto de la invención tiene propiedades agonistas de luliberina, es decir imita las acciones de luliberina, una hormona natural segregada por el hipotálamo que actúa sobre la glándula pituitaria haciendo que esta libere hormona luteinizante (LH) y folículos que estimulan la hormona (FSH). Estas dos hormonas pituitarias están implicadas en el control de los procesos reproductivos, actuando la última, FSH, sobre los ovarios para promover la maduración de folículos y la primera, (LH) para inducir la ovulación. El compuesto de fórmula I es inesperadamente más potente que la luliberina en cuanto a su capacidad para liberar LH y por consiguiente resulta de utilidad en el control y/o mejora en la reproducción de animales. En particular, resulta de utilidad en la crianza de grandes animales domésticos durante el anestro y en cualquier situación de crianza artificial para controlar el tiempo de ovulación de una forma más precisa. Igualmente, puede ser de utilidad para mejorar los estados de infertilidad en el hombre y mujer.

25 El efecto agonista de luliberina del compuesto de la invención se puede demostrar, por ejemplo, mediante su capacidad para inducir la ovulación en ratas de estro constante esterilizadas con andrógenos, o mediante su capacidad para liberar LH y FSH, según se mide por el radio inmunoensayo de doble anticuerpo, en el plasma sanguíneo de ratas macho inmaduras o en el plasma sanguíneo de ovejas anestras o diestras.

30

El anterior ensayo sobre ratas esterilizadas con andrógenos se efectúa como sigue:

5 Ratas hembra esterilizadas con andrógeno, preparadas por tratamiento de las ratas a los 3, 4 y 5 días de edad con 100 μ g de propionato de testosterona, tienen un frotis vaginal de estro persistente y numerosos folículos preovulatorios en los ovarios. La administración de luliberina y análogos activos causa la liberación de un golpe ovulatorio de LH y FSH que se puede evaluar por la presencia de ovulos
10 en las trompas de falopio y luteos corporeos frescos en los ovarios.

Todos los compuestos ejemplificados en esta memoria son más activos que la luliberina en cuanto a su capacidad para inducir la ovulación en ratas de estro constante y, en adición, no muestran efectos tóxicos cuando se dosifican en al menos cuatro veces su dosis activa mínima.
15 En particular, los compuestos preferidos de la invención, los descritos en los ejemplos 4, 6 y 7, son aproximadamente 100 veces tan activos como la luliberina y no exhiben efectos tóxicos cuando se dosifican a 100 veces su dosis eficaz
20 mínima.

De acuerdo con otra característica de la invención, se proporciona una composición farmacéutica o veterinaria que comprende, como ingrediente activo, al compuesto de la invención, en asociación con un diluyente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable.
25

La composición de la invención puede estar, por ejemplo, en una forma adecuada para la administración oral o bucal, por ejemplo una tableta, cápsula, solución o suspensión; administración nasal, por ejemplo una caja de aspira-
30

ción, pulverización nasal o gotas nasales; administración vaginal o rectal, por ejemplo un supositorio; o administración parenteral, por ejemplo una solución o suspensión inyectable esteril.

5 En general, las composiciones anteriores se pueden preparar de forma convencional empleando excipientes convencionales. Sin embargo, y en el caso de una composición para administración oral, puede ser conveniente que la composición incluya un revestimiento para proteger al polipéptido
10 activo de las acciones de las enzimas del estómago.

 La composición de la invención puede contener también, además del polipéptido de la invención, una o más drogas conocidas seleccionadas entre un derivado de prostaglandina tal como prostaglandina F_2^α , cloprostenol o fluprostenol u otra droga tal como clomifeno o tamoxifen.
15

 Una composición preferida de la invención es aquella que resulta adecuada para la administración oral en forma de una unidad de dosificación, por ejemplo una tableta, cápsula, sello, etc., que contiene de 2,5 a 500 mg y con preferencia de 10 a 100 mg de polipéptido en cada unidad de dosificación, o una composición que resulta adecuada para la administración parenteral y que contiene de 5 μ g a 1 mg de polipéptido por ml y con preferencia de 10 a 100 μ g de polipéptido por ml de solución.
20

25 Una composición parenteral es con preferencia una solución en salina isotónica o dextrosa isotónica, taponada si es necesario a un pH de 5 a 9. Alternativamente, la composición parenteral puede ser aquella diseñada para una lenta liberación en cuyo caso, la cantidad de polipéptido por
30 unidad de dosificación es en general superior a la requerida

cuando se utiliza una formulación inyectable convencional.

La formulación parenteral de lenta liberación, preferida, contiene de 100 μ g a 1 mg de polipéptido por unidad de dosificación.

5 La composición de la invención se administrará normalmente de modo que la dosis oral diaria sea de 50 μ g/kg a 20 mg/kg y la dosis parenteral diaria, por ejemplo por inyección o infusión intravenosa, subcutánea o intramuscular, sea de 0,2 a 100 μ g/kg. En personas, estas dosis son equivalentes
10 a una dosis diaria total de 3,5 mg a 1,4 g administrados oralmente y una dosis diaria total de 14 μ g a 7 mg administrados parenteralmente. Cuando se administran por vía de las membranas mucosas, la gama de dosificación será intermedia entre las gamas orales y parenterales ofrecidas anteriormente.

15 La invención se ilustra, pero no se limita, por los siguientes ejemplos:

 En los ejemplos, R_f se refiere a la cromatografía de capa fina ascendente (t.l.c.) sobre placas de gel de sílice (Kieselgel G). Los sistemas disolventes utilizados en
20 esta cromatografía fueron butan-1-ol/ácido acético/agua (4:1:5 v/v) (R_{fA}), butan-1-ol/ácido acético/agua/piridina (15:3:12:10 v/v) (R_{fB}), butan-2-ol/3% p/v hidróxido amónico acuoso (3:1 v/v) (R_{fC}), acetonitrilo/agua (3:1 v/v) (R_{fD}), acetona/cloroformo (1:1 v/v) (R_{fE}), cloroformo/etanol (1:4 v/v)
25 (R_{fF}), ciclohexano/acetato de etilo (1:1 v/v) (R_{fG}), ciclohexano/acetato de etilo/metanol (1:1:1 v/v) (R_{fH}), cloroformo/metanol/agua (11:8:2 v/v) (R_{fK}), cloroformo/metanol (19:1 v/v) (R_{fP}) y cloroformo/metanol (9:1 v/v) (R_{fQ}).

30 En todos los casos, las placas fueron examinadas bajo luz ultravioleta y tratadas con fluorescamina, ninhidrina y reac-

tivos de cloro-almidón-yoduro. A menos que se diga lo contrario, la anotación de un valor R_f implica que se reveló una sola mancha mediante estos métodos.

5 Los hidrolisatos ácidos de todos los productos descritos en esta memoria fueron preparados por calentamiento del péptido o péptido protegido con ácido clorhídrico 6N conteniendo 1% p/v de fenol en un tubo evacuado y sellado, durante 16 horas a 100°C. La composición aminoácida de cada hidrolisato fue determinada con un analizador de aminoácidos 10 LoCarte y, en cada caso, estaba de acuerdo con la composición esperada. El término "elaborado en la forma usual" empleado en los ejemplos, implica que después de la reacción cualquier residuo sólido fue separado por filtración, evaporándose el filtrado hasta sequedad por debajo de 40°C, para lavar luego 15 el residuo en acetato de etilo con una solución al 20 % de ácido cítrico, agua, solución saturada de bicarbonato sódico y agua, secado sobre sulfato sódico anhidro y evaporación del acetato de etilo in vacuo, para dejar libre el compuesto.

EJEMPLOS 1 a 10

20 Síntesis de L-pirolutamil-L-histidil-L-triptofil-L-seril-L-tirosil-A-L-leucil-L-arginil-L-prolil-E-F. Proceso general (m)
(Esquemas 1 y 2).

25 A una suspensión fría (0°C y agitada de hidrazida de L-pirolutamil-L-histidina (0,2 mmoles) en 0,9 ml de dimetilformamida y 0,7 ml de dimetilsulfóxido, se añade cloruro de hidrógeno 5,7N en 0,8 mmoles de dioxano. Después de agitar vigorosamente durante 5 minutos, se obtiene una solución clara. La solución se enfría a -20°C, se añaden 0,22 mmoles de nitrito de t-butilo y la agitación se continua durante 30 25 minutos. La temperatura se disminuye entonces a -30°C y la

solución se neutraliza añadiendo 0,8 mmoles de trietilamina). Se añade una mezcla preenfriada (-20°C) de 0,1 mmoles de dihidrocloruro de L-triptofil-L-seril-L-tirosil-A-L-leucil-L-arginil-L-prolil-E-F (obtenido por hidrogenolisis del derivado N-benciloxicarbonilo en metanol acuoso al 80 % v/v conteniendo dos equivalentes de cloruro de hidrógeno sobre un catalizador de paladio-carbón vegetal al 5 % p/p durante 16 horas) y 0,1 mmoles de trietilamina en 1 ml de dimetilformamida y la mezcla de reacción se agita durante 24 horas a 4°C. Se evapora la dimetilformamida in vacuo y el residuo se cromatografía sobre Sephadex LH-20 empleando dimetilformamida como eluente. El hidrocloreuro del péptido se purifica adicionalmente por cromatografía de distribución sobre Sephadex G-25 empleando el sistema disolvente n-butanol/ácido acético/agua/piridina (5:1:5:1 v/v).

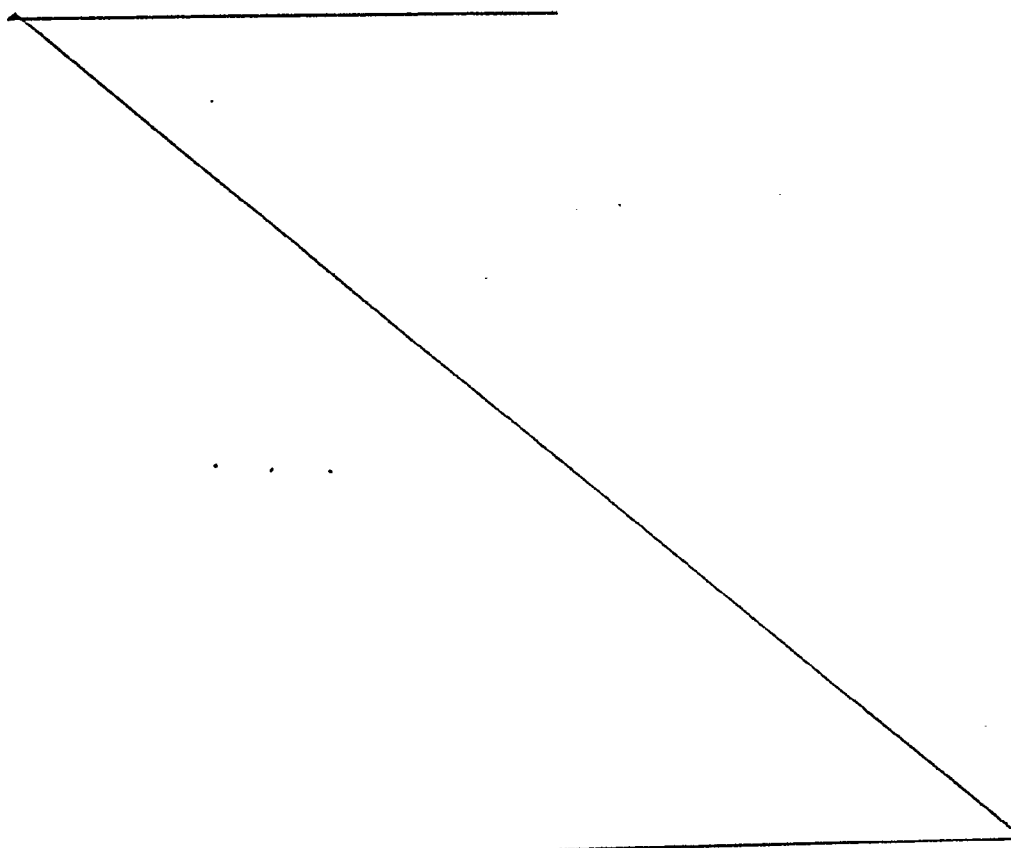
Síntesis de L-piroglutamil-L-histidil-L-triptofil-L-seril-L-tirosil-A-B-L-arginil-L-prolil-azaglicinamida. Proceso general (n) (Esquemas 3, 4 y 5)

Se disuelven 0,2 mmoles de hidrazida de L-piroglutamil-L-histidil-L-triptofil-L-serina en 4 ml de dimetilformamida y se convierte a la azida en la forma descrita en el proceso (m). Se acopla, como se describe en el proceso (m) con 0,15 mmoles de hidrocloreuro de amida de L-tirosil-A-B-L-arginil-L-prolil-azaglicina, preparado por reducción catalítica de amida de N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-A-L-leucil-(N^w-nitro)-L-arginil-L-prolil-azaglicina en metanol acuoso al 80% v/v durante 20 horas sobre paladio-carbón vegetal al 5% p/p y el producto final, en forma del hidrocloreuro, se purifica como anteriormente.

Síntesis de L-piroglutamil-L-histidil-L-triptofil-L-seril-L-tirosil-A-B-L-arginil-L-prolil-azaglicinamida. Proceso general (o) (Esquemas 4 y 6).

5 Una solución del derivado deca péptido protegido (que tiene Ser(Bu^t) en posición 6 ó Tyr(Bu^t) en posición 5) (50 mg) se disuelve en 5 ml de ácido trifluoracético acuoso al 90 % v/v. Se añaden tres gotas de β-mercaptoetanol y la solución se deja a temperatura ambiente durante 45 minutos. El disolvente se separa in vacuo y el residuo se liofiliza
10 una vez en agua y dos veces en t-butanol. Rendimiento 90-100%.

Los compuestos de la invención preparados por uno de estos tres procedimientos generales, se ofrecen en los ejemplos 1 a 10 de la siguiente Tabla.



13a

TABLA

Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F

| Ejemplo No. | A | B | E | F | Proceso | Rendimiento |
|-------------|-------------------------|-------|-------|----------------------------------|---------|-------------|
| 1 | Azgly | Leu | - | -NHC ₂ H ₅ | m | 25 |
| 2 | Azala | Leu | - | -NHC ₂ H ₅ | m | 42 |
| 3 | D-Ala | Leu | Azgly | NH ₂ | m | 32 |
| 4 | D-Phe | Leu | Azgly | NH ₂ | n | 40 |
| 5 | D-Trp | Leu | Azgly | NH ₂ | n | 15 |
| 6 | D-Tyr(Me) | Leu | Azgly | NH ₂ | n | 15 |
| 7 | D-Ser(Bu ^t) | Leu | Azgly | NH ₂ | n | 31 |
| 8 | D-Ser | Leu | Azgly | NH ₂ | o | 95 |
| 9 | D-Phe | MeLeu | Azgly | NH ₂ | o | 46 |
| 10 | D-Tyr(Me) | MeLeu | Azgly | NH ₂ | n | 26 |

| Electroforesis de papel R _F (respecto a luliberina) | | R _F A |
|---|--------|------------------|
| pH 2,1 | pH 6,5 | |
| 0,98 | 1,03 | 0,28 |
| 0,97 | 1,0 | 0,30 |
| 0,97 | 1,0 | 0,30 |
| 1,0 | 0,71 | 0,27 |
| 0,53 | 0,37 | 0,37 |
| 0,92 | 0,87 | 0,25 |
| 0,94 | 0,96 | 0,25 |
| 0,94 | 0,96 | 0,25 |
| 0,84 | 0,87 | 0,35 |
| 0,87 | 0,90 | 0,34 |

Los materiales de partida para utilizarse en los procesos anteriores se pueden obtener como se indica en los siguientes esquemas 1 y 2 (proceso (m), esquemas 3, 4 y 5 (proceso (n)) y esquemas 4 y 6 (proceso (o))).

5 En estos esquemas, se emplean las siguientes contracciones:

Ocp = éster 2,4,5-triclorofenilo

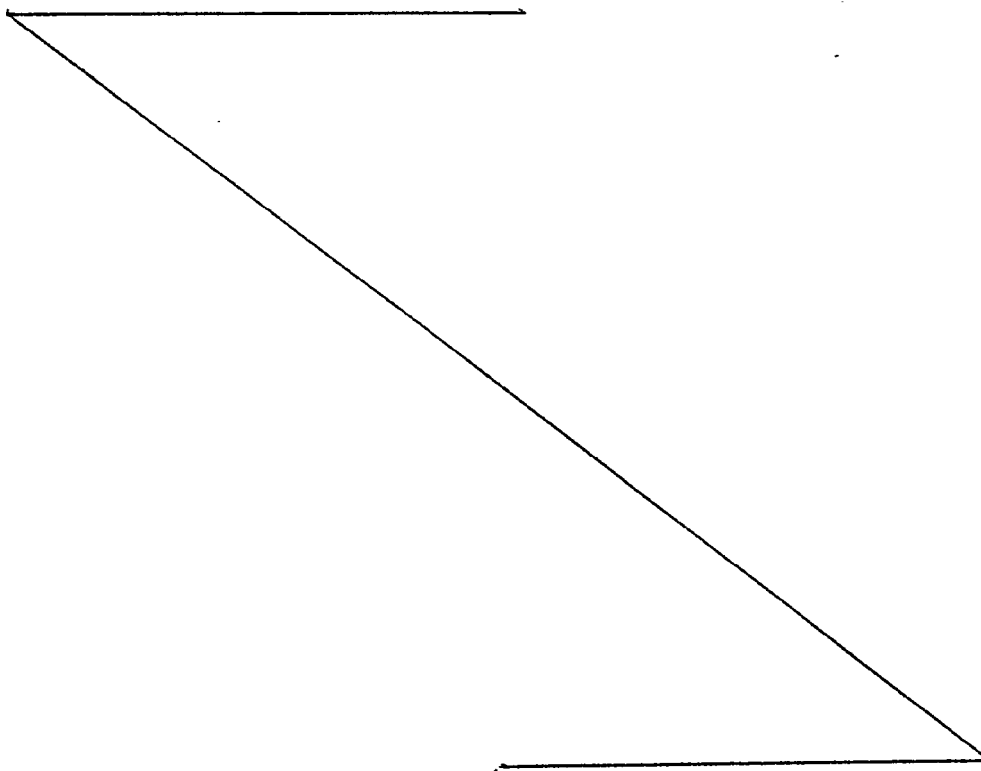
Bzl = bencilo

Z = benciloxycarbonilo

10 Boc = t-butoxicarbonilo

DMF = dimetilformamida

Los números encerrados en un círculo se refieren a la etapa particular implicada.



| Glu | His | Trp | Ser | Tyr | D-Ala | Leu | Arg | Pro | Azgly |
|-----|-----|----------------------|-----|----------------------------------|-------------------------|----------|-------------------------------|----------|-----------------------|
| | | | | Z- Bzl / Ocp | H- Ome | Z- OH | H- NO ₂ / OH | Z- OH | H- NH ₂ |
| | | Z- OH | | Z- Bzl / Ome | Z- Ome | Z- OH | H- NO ₂ / OH | Z- OH | NH ₂ |
| | | Z- OH | | Z- Bzl / NHNH ₂ | Z- NHNH ₂ | Z- OH | H- NO ₂ / OH | H- OH | NH ₂ |
| | | Z- OH | | Z- Bzl / N ₃ | Z- N ₃ | H- OH | H ⁺ | H- OH | NH ₂ |
| | | Z- OH | | Z- Bzl / NHNH ₂ | Z- NHNH ₂ | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | Z- OH | | H- N ₃ | H- N ₃ | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | Z- OH | | | | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | H- N ₃ | | | | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | | | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | | | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | | | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | | | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | | | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | | | | H ⁺ | | NH ₂ |

Esquema 2

| Glu | His | Trp | Ser | Tyr | A | Leu | Arg | Pro | Azgly |
|------|-------------------|-----------|-------------------|------------|----------------|-------------------|------------------------|-----------|-------------------|
| | H-Ome | | | | Z-OH (40) (50) | H-Ome | | Z-OH (25) | H-NH ₂ |
| (16) | Ome | Z-OH (12) | H-Ome | Bzl Ocp | H (41) (51) | Ome | | Z (26) | NH ₂ |
| (17) | NHNH ₂ | Z (42) | Ome | Bzl | (52) | Ome | Boc NO ₂ | H (38) | NH ₂ |
| (46) | N ₃ | H (47) | Ome | Bzl (43) | (53) | NHNH ₂ | Boc NO ₂ | (39) | NH ₂ |
| | (48) | | Ome | Bzl (44) | (54) | N ₃ | H | | NH ₂ |
| | (49) | | NHNH ₂ | Bzl | (55) | (45) (55) | NO ₂ | | NH ₂ |
| | | | N ₃ | H | | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | | | | H ⁺ | | NH ₂ |

A = D-Phe, D-Trp,

Esquema 3

| Clu | His | Trp | Ser | Tyr | A | Leu | Arg | Pro | AzGly |
|-----|------|-----|-------------------|-----|---|-------------------|-----------------|------|-----------------|
| | | | | Z | Z | H | | | |
| | | | | Bzl | Z | H | | | |
| | | | | Bzl | Z | OMe | | | |
| | | | | Bzl | Z | OMe | | | |
| | | | | Bzl | Z | OMe | | | |
| | | | | Bzl | Z | NHNH ₂ | | | |
| | | | | Bzl | Z | N ₃ | NO ₂ | (39) | NH ₂ |
| | | | | Bzl | Z | | NO ₂ | | NH ₂ |
| | (49) | | NHNH ₂ | Z | | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | N ₃ | H | | | H ⁺ | | NH ₂ |

A = D-Tyr(Me), D-Ser(Bu^t)

Esquema 4

| Glu | His | Trp | Ser | Tyr | D-Phe | MeLeu | Arg | Pro | AzGly |
|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-------------------|-----------------|------|-----------------|
| | | | | Z | Z | H-OMe | | | |
| | | | | Z | Z | OMe | | | |
| | | | | Z | H | OMe | | | |
| | | | | Z | But | OMe | | | |
| | | | | Z | But | OMe | | | |
| | | | | Z | But | NHNH ₂ | | | |
| | | | | Z | But | N ₃ | H | (39) | NH ₂ |
| | | | | Z | But | | NO ₂ | | NH ₂ |
| | | | | Z | But | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | H | But | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | | But | | H ⁺ | | NH ₂ |
| | | | | | | | | | NH ₂ |

Esquema 6

(49)

5 Etapa ①. Se disuelven 19,94 g (80 mmoles) de N-benciloxi-carbonil-L-prolina y 8,8 ml (80 mmoles) de N-metilmorfolina en 200 ml de tetrahidrofurano seco y la solución se enfría a -20°C. Se añaden por gotas 7,15 ml (76 mmoles) de cloroformato de etilo y después de 2 minutos de agitación se añade una solución acuosa preenfriada (-20°C) al 70% de 20 ml (300 mmoles) de etilamina y se continúa la agitación durante 18 horas a 4°C. La mezcla de reacción se procesa del modo usual y el residuo se recristaliza en acetato de etilo/éter de petróleo (p.e. 60-80°C). Rendimiento 12,97 g. (58,7 %), p.f. 107-108°C., $[\alpha]_D^{25,5}$ -43,88° (c, 1 en metanol), R_F^D 0,69, R_F^E 0,53, R_F^F 0,67, R_F^H 0,62, R_F^P 0,57, R_F^Q 0,66.

15 Etapa ②. Reducción catalítica sobre 5% Pd/C en etanol acuoso conteniendo un equivalente de cloruro de hidrógeno, durante 5 horas, a temperatura ambiente.

20 Etapa ③. Una solución de N^α-t-butoxicarbonil-N^ω-nitro-L-arginina (13,5 g., 42,3 mmoles), hidrocloreuro de L-prolina etilamida (7,15 g, 47 mmoles) 1-hidroxibenzotriazol (11,5 g, 85 mmoles) y trietilamina (6,58 ml, 47 mmoles) en DMF, se enfría a 0°C y se añade dicitclohexilcarbodiimida (9,13 g, 44,4 mmoles). La mezcla de reacción se agita durante la noche a 4°C, se filtra para separar el material sólido y el filtrado se evapora hasta sequedad in vacuo. El residuo se distribuye entre acetato de etilo y agua mediante distribución en contracorriente (4 transferencias). Las fases acuosas se combinan, se evaporan hasta sequedad y el residuo se distribuye entre n-butanol y ácido acético acuoso al 5 % v/v mediante distribución en contracorriente (12 transferencias). El péptido en bruto obtenido por evaporación de las fases de n-butanol
25
30 combinadas, se purifica por cromatografía en columna de gel

de sílice empleando 5 % v/v de metanol en cloroformo y 10% v/v de metanol en cloroformo como disolventes de elución. Las fracciones que contienen producto se combinan, evaporan hasta sequedad y se pasa una solución acuosa del residuo a través de una columna de resina intercambiadora de aniones (AG 1-X2) para separar N^α-t-butoxicarbonil-N^ω-nitro-arginina. La columna se lava luego con agua y las fases acuosas y los lavados en combinación se liofilizan para dar el derivado azapéptido, rendimiento 16,67 g (89%), p.f. 109-111°C. (descomposición), $[\alpha]_D^{25}$ -39,0° (c, 1 en metanol), R_FA 0,62, R_FB 0,74, R_FC 0,59, R_FD 0,70, R_FE 0,20, R_FF 0,60, R_FH 0,61, R_FK 0,85, R_FQ 0,13.

Etapa ④. Se disuelve el derivado N-t-butoxicarbonilo en acetato de etilo y se trata con ácido clorhídrico 3N en una solución de acetato de etilo (cuatro equivalentes) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Etapa ⑤ (R=H). Una solución de t-butoxicarbonilhidrazida (2,90 g, 22 mmoles) y éster de 2,4,5-triclorofenilo de N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosina (11,71 g, 20 mmoles) en 40 ml de dimetilformamida, se mantiene durante la noche a temperatura ambiente. La elaboración del modo usual seguido por la recristalización del residuo en éter/éter de petróleo (p.e. 60-80°C), proporciona la hidrazida protegida como un polvo blanco, 3,46 g., (67%), p.f. 126-127°, $[\alpha]_D^{25}$ -13,2° (c, 1 en metanol), R_FD 0,82, R_FE 0,65, R_FF 0,63, R_FH 0,70.

Etapa ⑥ (R=H). Se disuelven 5,19 g (10 mmoles) de 1-(N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil)-2-t-butoxicarbonilhidrazida en 50 ml de acetato de etilo y se trata con cloruro de hidrógeno 5N en acetato de etilo (8 ml, 40 mmoles) durante 1 hora a temperatura ambiente. El acetato de etilo se separa

in vacuo y el hidrocloreuro se filtra con éter y se seca.

Etapa ⑦ (R=H). El hidrocloreuro anterior se recibe en 75 ml de tetrahidrofurano y se añaden 1,15 g (8 mmoles) de trietilamina seguido por 1,36 g (8 mmoles) de éster metílico de
5 N-carbonil-L-leucina. Después de 16 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se elabora del modo usual y el residuo se recrystaliza en acetato de etilo/éter de petróleo (p.e. 60-80°C) para dar el derivado azatripéptido, 4,57 g. (77,7 %), p.f. 156-157°C., $[\alpha]_D^{24} -10,3^{\circ}$ (c, 1 en metanol),
10 R_F^D 0,81, R_F^E 0,45, R_F^F 0,26, R_F^Q 0,47.

Etapa ⑧ . Se añaden 5 ml (100 mmoles) de hidrato de hidrazina a una solución de 2,95 g (5 mmoles) de éster metílico de
N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosilazaglicil-L-leucina
15 en 50 ml de metanol. Después de 2 horas a temperatura ambiente, la hidrazida se precipita con agua y se recrystaliza en metanol/éter, rendimiento 2,74 g, (92,8%), p.f. 169-170°C.,
 $[\alpha]_D^{24} -9,05^{\circ}$ (c, 1 en dimetilformamida), R_F^A 0,76, R_F^B 0,75,
 R_F^C 0,73, R_F^D 0,63, R_F^F 0,60, R_F^H 0,55.

Etapas ⑨ y ⑩ (R=H). Se disuelven 1,18 g (2 mmoles) de
20 hidrazida de N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-azaglicil-L-leucina en 10 ml de dimetilformamida y después de enfriar la solución a -20°C, se añade una solución 5,49M de cloruro de hidrógeno en dioxano (1,46 ml, 8 mmoles) seguido por
nitrito de t-butilo (0,25 ml, 2,2 mmoles). Después de 5 minutos,
25 la solución se enfría a -30°C y se añade una mezcla preenfriada de 0,836 g (2,2 mmoles de hidrocloreuro de etilamida de N^w-nitro-L-arginil-L-prolina y 1,43 ml (10,2 mmoles) de trietilamina en 10 ml de dimetilformamida. La mezcla de reacción se agita a -10°C durante 1 hora y a 4°C durante 48 horas.
30 Se elabora del modo usual y el derivado pentapéptido se purifi-

ca por cromatografía en columna de gel de sílice empleando cloroformo y 3 % v/v de metanol en cloroformo como disolventes de elución, rendimiento 0,695 g (38,5 %), R_fA 0,71, R_fB 0,72, R_fC 0,84.

5 Etapa (11) (R=H). Reducción catalítica con 5% p/p de paladio sobre carbón vegetal en ácido acético acuoso al 80 % v/v conteniendo dos equivalentes de cloruro de hidrógeno.

10 Etapa (12) . A una solución vigorosamente agitada y enfriada (-20°C) de 33,84 g (100 mmoles) de N-benciloxicarbonil-L-triptofano y 11 ml (100 mmoles) de N-metilmorfolida en 200 ml de tetrahidrofurano, se añaden 9 ml (95 mmoles) de cloroformato de etilo. Después de 2 minutos, se añade una solución preenfriada (-20°C) de 17,10 g (110 mmoles) de hidrocloreuro de éster metílico de L-serina y 12,1 ml (110 mmoles) de N-metil-

15 morfolina en 150 ml de dimetilformamida y se continúa la agitación a -20°C durante 30 minutos y a temperatura ambiente durante 3 horas. La elaboración usual proporciona un aceite. Dos cristalizaciones en acetato de etilo/éter de petróleo (p.e. 60-80°C) proporciona el derivado dipéptido (30,53 g.,

20 69,5%), p.f. 140,5-141°C., $[\alpha]_D^{24}$ -22,13° (c, 1,4 en dimetilformamida).

Etapa (13) . Se disuelven 30,53 g (69,5 mmoles) del éster anterior en 1 litro de metanol y se añade una solución al 62 % p/v de 15 ml de hidrato de hidrazina. Después de 16

25 horas, se recoge la hidrazida, se lava con metanol y éter y se cristaliza en etanol caliente (23,18 g., 75,8 %), p.f. 178-179°C., $[\alpha]_D^{24}$ -25,27° (c, 1 en dimetilformamida) R_fD 0,65, R_fE 0,20, R_fF 0,43, R_fH 0,50.

30 Etapas (14) y (15) . Se añade cloruro de hidrógeno 6,02N en 0,77 ml (4,64 mmoles) de dioxano a una solución fría (-20°C)

y agitada de 0,502 g (1,16 mmoles) de hidrazida de N-bencil-oxycarbonil-L-triptofil-L-serina en 5 ml de dimetilformamida seguido por 0,14 ml (1,22 mmoles) de nitrito de t-butilo.

Después de 30 minutos, la solución se enfria a -30°C y se neutraliza por adición de 0,65 ml (4,65 mmoles) de trietilamina. Se añade una mezcla preenfriada (-20°C) de 0,547 g (0,77 mmoles) de dihidrocloruro de etilamida de L-tirosilazaglicil-L-leucil-L-arginil-L-prolina y 0,108 ml (0,77 mmoles) de trietilamina en 5 ml de dimetilformamida y se continua la agitación durante 1 hora a -20°C y durante 48 horas a 4°C.

La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se evapora hasta sequedad in vacuo. El péptido en bruto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando cloroformo, 10 % v/v de metanol en cloroformo y una mezcla de cloroformo-metanol-agua (11:8:2 v/v) como disolventes de elución, rendimiento 0,424 g. (52,9 %), $[\alpha]_D^{25} -16,84^\circ$ (c, 1,5 en metanol), $R_{fA} 0,61$, $R_{fC} 0,36$, $R_{fD} 0,67$, $R_{fK} 0,90$.

Etapa (18) (R=Me). Como la etapa (5), rendimiento 66 %, p.f. 102-104°C., $[\alpha]_D^{24} -15,5^\circ$ (c, 1 en metanol), $R_{fD} 0,76$, $R_{fE} 0,68$, $R_{fF} 0,76$, $R_{fH} 0,74$.

Etapa (19) (R=Me). Como la etapa (6).

Etapa (20) (R=Me). Como la etapa (7), rendimiento 93%, p.f. 145-146°C., $[\alpha]_D^{25} +8,7^\circ$ (c, 1,2 en metanol), $R_{fA} 0,88$, $R_{fB} 0,88$, $R_{fC} 0,83$, $R_{fD} 0,80$, $R_{fE} 0,59$, $R_{fF} 0,78$, $R_{fH} 0,73$.

Etapa (21). Se añaden 12 ml (12 mmoles) de hidróxido sódico 1N a una solución agitada de 2,41 g (4 mmoles) de éster metílico de N-benciloxycarbonil-O-bencil-L-tirosil-azalanil-L-leucina en 36 ml de metanol a temperatura ambiente y se continua la agitación durante 3 horas. El metanol se separa in vacuo y se acidifica 40 ml de una solución acuosa del residuo

con ácido cítrico (pH 3) y se extracta con acetato de etilo. Después de lavar el extracto de acetato de etilo con agua y secar (Na_2SO_4), se evapora el disolvente y se aplica el residuo, en una mezcla de dimetilformamida-agua (3:2 v/v, 200 ml) a una columna de resina AG 1 x-2 (100 ml). La columna se lava con el disolvente anterior (50 ml) y el tripéptido se eluye con ácido acético 0,2M en dimetilformamida-agua (3:2 v/v). Las fracciones que contienen tripéptido se combinan, se evaporan in vacuo y el residuo se tritura con éter reuniéndose a continuación 1,22 g (51,7 %), p.f. 195°C, (descomp.), $[\alpha]_D^{24} -25,42$ (c, 1 en dimetilformamida). Etapa (22) (R=Me). Como etapa (28), rendimiento 43 %, $[\alpha]_D^{25} -25,92$ (c, 1 en metanol), $R_{fA} 0,72$, $R_{fB} 0,76$, $R_{fC} 0,85$. Etapa (23) (R=Me). Como etapa (11). Etapa (24) (R=Me). Igual que la etapa 15 excepto que el producto final se purifica también por filtración de gel sobre Sephadex LH-20 en dimetilformamida después de la cromatografía en columna de gel de sílice, rendimiento 63 %, $[\alpha]_D^{25} -24,762$ (c, 0,8 en metanol), $R_{fA} 0,58$, $R_{fC} 0,42$, $R_{fD} 0,65$, $R_{fK} 0,95$. Etapa (25). A una suspensión agitada y enfriada (0°C) de 24,9 g (100 mmoles) de N-benciloxicarbonil-L-prolina, 11,2 g (100 mmoles) de hidrocloreuro de semicarbazida y 14,5 ml (100 mmoles) de trietilamina en 200 ml de dimetilformamida, se añaden 20,6 g (100 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida y se continua la agitación durante 16 horas a 4°C. Se separa por filtración la dicitclohexilurea y el filtrado se evapora a un pequeño volumen. Se añaden 200 ml de agua y la solución se extracta con acetato de etilo (3 x 50 ml). El producto precipita de la solución acuosa en 1 hora aproximadamente. La recristalización en metanol acuoso proporciona la amida dipéptida (16,5 g., 53,9 %), p.f. 189-190°C., $[\alpha]_D^{24} -43,62$ (c, 1,4 en dimetilformamida), $R_{fD} 0,54$, $R_{fF} 0,52$, $R_{fH} 0,38$, $R_{fK} 0,78$.

Etapa (26) . Reducción catalítica sobre 5 % p/p de paladio sobre carbón vegetal en dimetilformamida acuosa al 80 % v/v durante 6 horas, a temperatura ambiente, en presencia de dos equivalentes de cloruro de hidrógeno.

5 Etapa (27) . Se añaden 2,83 ml (29,5 mmoles) de cloroformato de etilo a una solución de 8,24 g (31 mmoles) de N-benciloxi-carbonil-L-leucina y 4,55 ml (32,5 mmoles) de trietilamina en 100 ml de tetrahidrofurano, a una temperatura de -10 a -15°C. La mezcla de reacción se agita durante 3 minutos a esta tempe-
10 ratura y se vierte entonces en una solución fuertemente agitada de 5,79 g (31 mmoles) de N^ω-nitro-L-arginina en 15,5 ml (31 mmoles) de hidróxido sódico 2N y 50 ml de dimetilformamida a -10°C. La agitación se continua a -10°C durante 30 minutos y luego a temperatura ambiente durante 1 hora. Los disolventes
15 se separan in vacuo y el residuo se distribuye entre 50 ml de acetato de etilo y 50 ml de agua. La fase acuosa se separa y extracta con dos porciones más de acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavan una vez más con 25 ml de agua y se desechan . Las fases acuosas combinadas se acidifican con
20 solución saturada de ácido cítrico y se extractan con acetato de etilo (3 x 100 ml). Los extractos de acetato de etilo se combinan, se lavan con agua, se secan (Na₂SO₄) y se evaporan hasta sequedad. La recristalización del residuo en acetato de etilo/éter de petróleo (p.e. 60-80°C) proporciona el dipéptido
25 (8,98 g., 62 %), p.f. 150-165°C (descomp.).

Etapa (28) . Se enfria a 0°C una solución de 9,2 g (20 mmoles) de N-benciloxicarbonil-L-leucil-(N^ω-nitro)-L-arginina, 4,2 g (20 mmoles) de hidrocioruro de amida de L-prolilazaglicina, 5,4 g (40 mmoles) de 1-hidroxibenzotriazol y 3 ml (20 mmoles)
30 de trietilamina en 200 ml de dimetilformamida y se añaden a la

solución 8,2 g (40 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida. La mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente. La dicitclohexilurea se separa por filtración y el filtrado se evapora hasta sequedad. La recristalización del residuo en metanol-éter proporciona el derivado tetrapéptido (12,2 g., 98,3 %), p.f. 88-90°C., $[\alpha]_D^{24} -30,2^\circ$ (c, 1,6 en dimetilformamida), R_F^D 0,57, R_F^F 0,40, R_F^H 0,26, R_F^K 0,63.

5 Etapa (29) . Hidrogenación sobre 5 % p/p de paladio en carbón vegetal en etanol acuoso durante 16 horas, en presencia de dos equivalentes de cloruro de hidrógeno.

10 Etapa (30) . En 50 ml de dimetilformamida se disuelven 6,484 g (11 mmoles) de éster de N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosina-2,4,5-triclorofenilo y 1,396 g (10 mmoles) de hidrocioruro de éster metílico de D-alanina y se añaden a la solución 1,4 ml (10 mmoles) de trietilamina, agitándose la solución durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se elabora del modo usual y el residuo se cristaliza en acetato de etilo caliente para dar 3,782 g, 77,2 % del éster metílico del dipéptido protegido, p.f. 163°C., $[\alpha]_D^{24,8} -12,84^\circ$ (c, 1,1 en dimetilformamida).

15 Etapa (31) . Se disuelven 3,435 g (7 mmoles) de éster metílico de N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-alanina en 400 ml de metanol caliente y la solución se trata con 10 ml (120 mmoles) de hidrato de hidrazina al 62 % p/v y la mezcla se deja a 25°C durante la noche. La hidrazida se filtra, se lava con metanol y éter y se cristaliza dos veces en metanol hirviendo, Rendimiento 3,068 g., 89,2 %, p.f. 217°C., $[\alpha]_D^{24} -20,44^\circ$ (c, 1,1 en dimetilformamida) R_F^A 0,73, R_F^B 0,75, R_F^C 0,67, R_F^D 0,70, R_F^E 0,50, R_F^F 0,54, R_F^H 0,67, R_F^K 0,85, R_F^Q 0,25.

25 Etapas (32) y (33) . A una solución fría (-20°C) y agitada

30

de 1,18 g (2,4 mmoles) de hidrazida de N-benciloxycarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-alanina, se añade una solución 6,02 M de cloruro de hidrógeno en 1,6 ml (9,6 mmoles) de dioxano seguido por 0,29 ml (2,52 mmoles) de nitrito de t-butilo. Después de 5 15 minutos se añade una solución de 1,03 g (2 mmoles) de hidrocloreuro de amida de L-leucil-L-arginil-L-prolilazaglicina y 1,62 ml (11,6 mmoles) de trietilamina en 15 ml de dimetilformamida. La agitación se continua a 4°C durante 24 horas. El hidrocloreuro de trietilamina se separa por filtración y el 10 filtrado se evapora hasta sequedad in vacuo. El residuo se carga en una columna de gel de sílice la cual se eluye con 5 % v/v de metanol en cloroformo, 10 % v/v de metanol en cloroformo y una mezcla de cloroformo/metanol/agua (11:8:2 v/v). Las 15 fracciones que contienen producto se combinan y evaporan y el péptido se cromatografía de nuevo sobre una columna de gel de sílice empleando acetonitrilo/agua (3:1 v/v) como agente de elución, rendimiento 890 mg (46,4 %), $[\alpha]_D^{25} -45,7^\circ$ (c, 1,1 en metanol), R_{fA} 0,54, R_{fB} 0,69, R_{fC} 0,41.

Etapa (34) . Como la etapa (11) .

20 Etapa (35) . Como la etapa (15) , rendimiento 43 %, $[\alpha]_D^{25} -41,4^\circ$ (c, 1,3 en metanol), R_{fA} 0,80, R_{fC} 0,47, R_{fD} 0,65, R_{fK} 0,95.

Etapa (38) . Como la etapa (3) , rendimiento 69%, p.f. 135°C. 25 R_{fA} 0,49, R_{fB} 0,65, R_{fC} 0,46, R_{fD} 0,64, R_{fF} 0,35, R_{fH} 0,19, R_{fK} 0,86.

Etapa (39) . Como la etapa (4) .

Etapa (40) (A=D-Phe). Una solución de 7,41 g (24,8 mmoles) de 30 N-benciloxycarbonil-D-fenilalanina y 3,62 g (25 mmoles) de éster metílico de L-leucina en 100 ml de acetato de etilo, se enfria a 0°C y se añade a la misma 5,15 g (25 mmoles) de

diciclohexilcarbodiimida. La mezcla de reacción se agita durante la noche a 4°C. La elaboración usual seguido por recristalización del residuo en acetato de etilo/éter de petróleo (p.e. 60-80°C) proporciona el dipéptido (9,1 g, 86%), p.f. 123-124°C., $[\alpha]_D^{26} -18,7^\circ$ (c, 2,1 en metanol), R_{fD} 0,76, R_{fE} 0,65, R_{fF} 0,74, R_{fH} 0,73.

Etapa (41) (A=D-Phe). Reducción catalítica sobre 5% p/p de paladio en carbón vegetal, en etanol conteniendo un equivalente de cloruro de hidrógeno, durante 5 horas.

Etapa (42) (A=D-Phe). A una solución agitada de 4,89 g (8,36 mmoles) de éster de 2,4,5-triclorofenilo de N-benciloxi-carbonil-O-bencil-L-tirosina y 2,5 g (7,6 mmoles) de hidrocloreuro de éster metílico de D-fenilalanil-L-leucina en dimetilformamida, se añaden 1,1 ml (7,6 mmoles) de trietilamina y la agitación se continua durante la noche a temperatura ambiente. El hidrocloreuro de trietilamina se filtra y el filtrado se evapora hasta sequedad. La recristalización del residuo en metanol acuoso proporciona el derivado tripéptido, 3,6 g (69,7%), p.f. 183-184°C., R_{fD} 0,82, R_{fE} 0,69, R_{fH} 0,78, R_{fP} 0,71, R_{fQ} 0,82.

Etapa (43) (A=D-Phe). Una solución de 3,42 g (5,04 mmoles) del éster metílico anterior y 60 mmoles de hidrato de hidrazina en 30 ml de dimetilformamida, se agita a temperatura ambiente durante 4 horas, se concentra a un pequeño volumen y la hidrazida se precipita por adición de 500 ml de agua. Se recoge, se lava con agua, metanol/éter (1:4 v/v) y éter y se seca. Rendimiento 2,94 g. (85,9%), p.f. 179-180°C., R_{fA} 0,81, R_{fB} 0,79, R_{fC} 0,88, R_{fD} 0,69, R_{fE} 0,49, R_{fF} 0,65, R_{fH} 0,67, R_{fP} 0,25, R_{fQ} 0,57.

Etapas (44) y (45) (A=D-Phe). Una solución de cloruro de hidró-

geno 6,02 M en 1,83 ml (11 mmoles) de dioxano se añade a una solución de 1,86 g (2,75 mmoles) de hidrazida de N-benciloxi-carbonil-O-bencil-L-tirosil-D-fenilalanil-L-leucina en 5 ml de dimetilformamida, a -20°C, seguido por 0,33 ml (2,89 mmoles) de nitrito de t-butilo. Después de 2 minutos, se añade una solución preenfriada (-20°C) de 1,89 ml (13,5 mmoles) de trietilamina y 1,02 g (2,5 mmoles) de hidrocloreuro de amida de N^ω-nitro-L-arginil-L-prolilazaglicina en 10 ml de dimetilformamida y la mezcla de reacción se agita durante la noche a 4°C. La elaboración usual proporciona el derivado hexapéptido que se purifica adicionalmente por cromatografía en columna de gel de sílice (120 g) empleando 5 % v/v de metanol en cloroformo, 10% v/v de metanol en cloroformo y una mezcla de cloroformo/metanol/agua (11:8:2 v/v) como disolventes de elución, Rendimiento 0,74 g. (29,3 %), p.f. 137-139°C., R_fA 0,68, R_fB 0,72, R_fC 0,58, R_fD 0,62, R_fH 0,39, R_fK 0,95.

Etapas (46), (47) y (48). Se convierten 10 mmoles de hidrazida de L-piroglutamil-L-histidina a la azida en la forma descrita en el procedimiento general (a) y se acopla con 11 mmoles del éster metílico de L-triptofil-L-serina (preparado por hidrogenación del derivado N-benciloxicarbonilo sobre 5 % p/p de paladio sobre carbón vegetal en dimetilformamida) a -10°C durante 30 minutos y a 4°C durante 24 horas. El hidrocloreuro de trietilamina se separa por filtración y el filtrado se evapora hasta sequedad. El péptido en bruto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando 10% v/v de metanol en cloroformo, 20 % v/v de metanol en cloroformo y una mezcla de cloroformo/metanol/agua (11:8:2 v/v) como disolventes de elución, rendimiento 70%, p.f. 142-145°C (descomp.), R_fA 0,39, R_fB 0,72, R_fC 0,45,

R_FD 0,48, R_FK 0,61.

5 Etapa (49) . Se disuelven 5,4 mmoles de éster metílico de L-piroglutamil-L-histidil-L-triptofil-L-serina en 70 ml de dimetilformamida y se trata con 100 mmoles de hidrato de hidrazina durante 4 horas. La dimetilformamida se separa in vacuo y el residuo se tritura con etanol, se recoge, se lava con etanol y éter y se seca (88,2 %), p.f. 184-189°C., R_FA 0,18, R_FB 0,55, R_FC 0,39, R_FD 0,27, R_FK 0,58.

10 Etapa (50) . (A=D-Trp). Se añaden 4,87 g (23,6 mmoles) de díciclohexilcarbodiimida a una solución de 7,27 g (21,5 mmoles) de N-benciloxicarbonil-D-triptofano, 3,12 g (21,5 mmoles) de éster metílico de leucina y 5,8 g (43 mmoles) de 1-hidroxibenzotriazol en 50 ml de dimetilformamida, a 0°C. La mezcla de reacción se agita durante la noche a temperatura ambiente
15 y se elabora del modo usual. La recristalización en acetato de etilo/éter de petróleo (p.e. 60-80°C) proporciona el derivado dipéptido (9,55 g) que muestra trazas de impurezas en cromatografía de capa fina. Se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (300 g) empleando cloroformo y 5%
20 v/v de metanol en cloroformo como disolventes de elución. Rendimiento 9,18 g. (91,7 %), p.f. 151-153°C., R_FA 0,84, R_FB 0,80, R_FC 0,86, R_FD 0,78, R_FE 0,61, R_FF 0,68, R_FH 0,73, R_FP 0,55, R_FQ 0,73.

25 Etapa (51) (A=D-Trp). Reducción catalítica en 80 % v/v de dimetilformamida acuosa sobre 5 % p/p de paladio en carbón vegetal durante 5 horas.

30 Etapa (52) (A=D-Trp). Se agita a temperatura ambiente, durante 60 horas, una solución de 11,69 g (20 mmoles) de éster de 2,4,5-triclorofenilo de N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosina, 6,28 g (19 mmoles) de éster metílico de D-triptofil-L-leucina

en 100 ml de dimetilformamida. La mezcla de reacción se elabora del modo usual y el residuo se cristaliza en acetato de etilo/éter de petróleo (p.e. 60-80°C) para dar el derivado tripéptido, 8,52 g (62,5 %), p.f. 165-166°C., R_fA 0,78, R_fB 0,73; R_fC 0,84, R_fD 0,80, R_fE 0,62, R_fF 0,70, R_fH 0,76, R_fP 0,58, R_fQ 0,68.

Etapa (53) (A=D-Trp). Una solución de 7,26 g (10,1 mmoles) de éster metílico de N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-triptofil-L-leucina en una mezcla de 200 ml de metanol y 50 ml de dimetilformamida, se trata con 100 mmoles de hidrato de hidrazina a temperatura ambiente. Después de 24 horas, la solución se concentra (unos 30 ml aproximadamente) y se añaden 500 ml de agua. Se recoge la hidrazida de tripéptido, se lava con agua, metanol/éter (1:4 v/v) y éter y se seca, 6,86 g (94,6 %), p.f. 200-202°C., R_fA 0,90, R_fB 0,95, R_fC 0,90, R_fD 0,74, R_fQ 0,59.

Etapas (54) y (55) (A=D-Trp). Una solución agitada y enfriada (-20°C) de 1,97 g (2,75 mmoles) de hidrazida de N-benciloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-triptofil-L-leucina en 10 ml de dimetilformamida, se trata con una solución 6,02 M de cloruro de hidrógeno en 1,83 ml (11 mmoles) de dioxano, seguido por 0,33 ml (2,89 mmoles) de nitrito de t-butilo. Después de 2 minutos, se añade una solución preenfriada (-20°C) de 1,02 g (2,5 mmoles) de hidrocloreuro de amida de N^w-nitro-L-arginil-L-prolil-azaglicina y 1,89 ml (13,5 mmoles) de trietilamina en 10 ml de dimetilformamida y la mezcla de reacción se agita durante la noche a 4°C. Se elabora del modo usual y el residuo (1,27 g) se aplica a una columna de gel de sílice (230 g) y la columna se eluye con cloroformo y 5 % v/v de metanol en cloroformo. Rendimiento 0,91 g. (34,4%), p.f. 139-

140°C (descomp.), R_{fA} 0,67, R_{fB} 0,72, R_{fC} 0,58, R_{fD} 0,62, R_{fH} 0,34, R_{fK} 0,95.

5 Etapa (56) (A=D-Tyr(Me)). Se enfría a 0°C una solución de 3,17 g (9,64 mmoles) de Z-D-Tyr(Me)-OH, 1,92 g (10,6 mmoles) de Leu-OMe.HCl, 2,6 g (19,2 mmoles) de 1-hidroxibenzotriazol y 1,6 ml (11 mmoles) de trietilamina en 30 ml de dimetilformamida y se añaden a la solución 2,29 g (11,1 mmoles) de N,N'-diciclohexilcarbodiimida. La mezcla de reacción se agita durante la noche a 4°C y se elabora luego del modo usual.

10 La recristalización en ciclohexano caliente proporciona el derivado dipéptido protegido. Rendimiento 1,41 g, (95,2%), R_{fD} 0,83, R_{fE} 0,69, R_{fF} 0,72, R_{fQ} 0,76.

15 Etapa (57) (A=D-Tyr(Me)). Reducción catalítica en 5 % p/p de paladio sobre carbón vegetal, en metanol/dimetilformamida/agua (8:1:1) conteniendo 1,2 equivalentes de cloruro de hidrógeno, durante 3 horas.

20 Etapa (58) (A=D-Tyr(Me)). Se agita durante la noche a temperatura ambiente una solución de 8,2 mmoles de Z-Tyr(Bzl)-OCp, 8,2 mmoles de D-Tyr(Me)-Leu-OMe.HCl y 8,2 mmoles de trietilamina en 60 ml de dimetilformamida y la mezcla de reacción se elabora entonces del modo usual. El producto se filtra con éter, se lava con éter y se seca. Rendimiento 81,2 %, p.f. 191-192°C., R_{fD} 0,85, R_{fE} 0,73, R_{fF} 0,72, R_{fQ} 0,78.

25 Etapa (59) (A=D-Tyr(Me)). Se añaden 12,9 mmoles de hidrato de hidrazina a una solución de 4,59 g (6,4 mmoles) de Z-Tyr(Bzl)-D-Tyr(Me)-Leu-OMe en 25 ml de dimetilformamida y 50 ml de metanol y la mezcla de reacción se deja durante la noche a temperatura ambiente. El metanol se separa in vacuo y el producto se precipita con agua, se recoge, se lava con agua y se seca, p.f. 212-213°C, R_{fE} 0,49, R_{fF} 0,66, R_{fH} 0,69, R_{fQ} 0,70.

30

5 Etapas (60) y (61) (A=D-Tyr(Me)). Se disuelven 3,54 g (5 mmoles) de la hidrazida de la etapa 59 en 10 ml de dimetilformamida y la solución agitada se enfría a -20°C. Se añade ácido clorhídrico 5,92 M en 3,38 ml (20 mmoles) de dioxano seguido por 0,6 ml (5,25 mmoles) de nitrito de t-butilo. Después de 2 minutos, se añade una solución preenfriada de 2,04 g (5 mmoles) de H-Arg(NO₂)-Pro-Azgly-NH₂.HCl y 3,55 ml (25 mmoles) de trietilamina en 10 ml de dimetilformamida y la agitación se continua durante la noche a 4°C. La mezcla de reacción se elabora del modo usual y el producto en bruto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando cloroformo, 5 % v/v de metanol en cloroformo y 10% v/v de metanol en cloroformo como disolventes de elución. Rendimiento 3,72 g. (70,9%), R_FA 0,64, R_FB 0,72, R_FC 0,55, R_FD 0,66, R_FF 0,40, R_FH 0,52.

10 Etapa (62) (A=D-Ser(Bu^t)). Como la etapa (56). El producto se cristaliza en metanol acuoso. Rendimiento 90,4%, p.f. 107-108°C., R_FD 0,80, R_FE 0,68, R_FF 0,73, R_FH 0,72, R_FP 0,72, R_FQ 0,74.

20 Etapa (63) (A=D-Ser(Bu^t)). Reducción catalítica en 5% p/p de paladio sobre carbón vegetal en dimetilformamida-agua (8:2) durante 5 horas.

25 Etapa (64) (A=D-Ser(Bu^t)). Una solución de 19,17 g (32,7 mmoles) de Z-Tyr(Bzl)-OCp y 32,7 mmoles de H-Ser(Bu^t)-Leu-OME en 100 ml de dimetilformamida, se deja a temperatura ambiente durante 72 horas. La elaboración usual proporciona un sólido que se recoge, se lava con éter y se seca. Rendimiento 17,6 g. (79,4%), p.f. 135-137°C. R_FD 0,80, R_FH 0,77, R_FQ 0,81.

30 Etapa (65) (A=D-Ser(Bu^t)). Como la etapa (59). Recristalizado en metanol acuoso. Rendimiento 56,2%, p.f. 134-136°C., R_FD 0,66, R_FH 0,64, R_FQ 0,64.

Etapas (66) y (67) (A=D-Ser(Bu^t)). Como la etapa (60) y (61).

El producto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando cloroformo y 5% v/v de metanol en cloroformo como disolventes de elución. Rendimiento 38,5%, p.f.

5 142-145°C., R_FA 0,64, R_FB 0,71, R_FC 0,55, R_FD 0,65, R_FF 0,46, R_FH 0,43, R_FQ 0,16.

Etapas (68) (A=D-Tyr(Me)). Se añaden 5,13 g (24,9 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida a una solución fría (0°C) y agitada

10 de 22,6 mmoles de Z-D-Tyr(Me)-OH, 5,98 g (24,9 mmoles) de H-MeLeu-OMe.HBr, 3,5 ml (24,9 mmoles) de trietilamina y 6,12 g (45,2 mmoles) de 1-hidroxibenzotriazol en 50 ml de dimetilformamida y la agitación se continúa durante la noche a 4°C.

15 La mezcla de reacción se elabora del modo usual y el producto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando cloroformo como disolvente. Rendimiento 55,2 %, aceite, R_FD 0,83, R_FE 0,78, R_FH 0,79, R_FF 0,80, R_FQ 0,79.

Etapas (69) (A= D-Tyr(Me)). Reducción catalítica en 5% p/p de paladio sobre carbón vegetal, en metanol/agua (8:1 v/v) conteniendo un equivalente de cloruro de hidrógeno durante 6 horas.

20 Etapas (70) (A=D-Tyr(Me)). Como la etapa (58) . El producto se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando éter como disolvente.

25 Etapas (71) (A=D-Tyr(Me)). Una solución de 4,85 g (6,69 mmoles) de Z-Tyr(Bzl)-D-Tyr(Me)-MeLeu-OMe y 120,7 mmoles de hidrato de hidrazina en 150 ml de metanol, se deja durante la noche a temperatura ambiente. La hidrazida se precipita por adición de agua, se recoge y cristaliza en metanol/agua. Rendimiento 91,1%, p.f. 129-131°C., R_FD 0,79, R_FE 0,60, R_FF 0,68, R_FH 0,73, R_FQ 0,77.

30 Etapas (72) y (73) (A=D-Tyr(Me)). Como las etapas (60) y (61) .

Recristalizado en metanol/éter, rendimiento 23,8 %, p.f. 152-154°C, R_fA 0,67, R_fB 0,68, R_fC 0,58, R_fD 0,59, R_fH 0,50, R_fK 0,94, R_fQ 0,35.

5 Etapa (74) . Se añaden 1,8 ml (18 mmoles) de cloroformato de etilo a una solución enfriada (-15°C) y agitada de 5,99 g (20 mmoles) de Z-Phe-OH y 2,2 ml (20 mmoles) de N-metilmorfolina en 60 ml de dimetilformamida. Después de 2 minutos, se añade una solución preenfriada (-15°C) de 4,8 g (20 mmoles) de H-MeLeu-OMe.HBr y 2,8 ml (20 mmoles) de trietilamina en 10 20 ml de dimetilformamida y la mezcla de reacción se agita durante 30 minutos a 0°C y durante la noche a temperatura ambiente. Se elabora del modo usual. Rendimiento 7,54 g (90%), aceite.

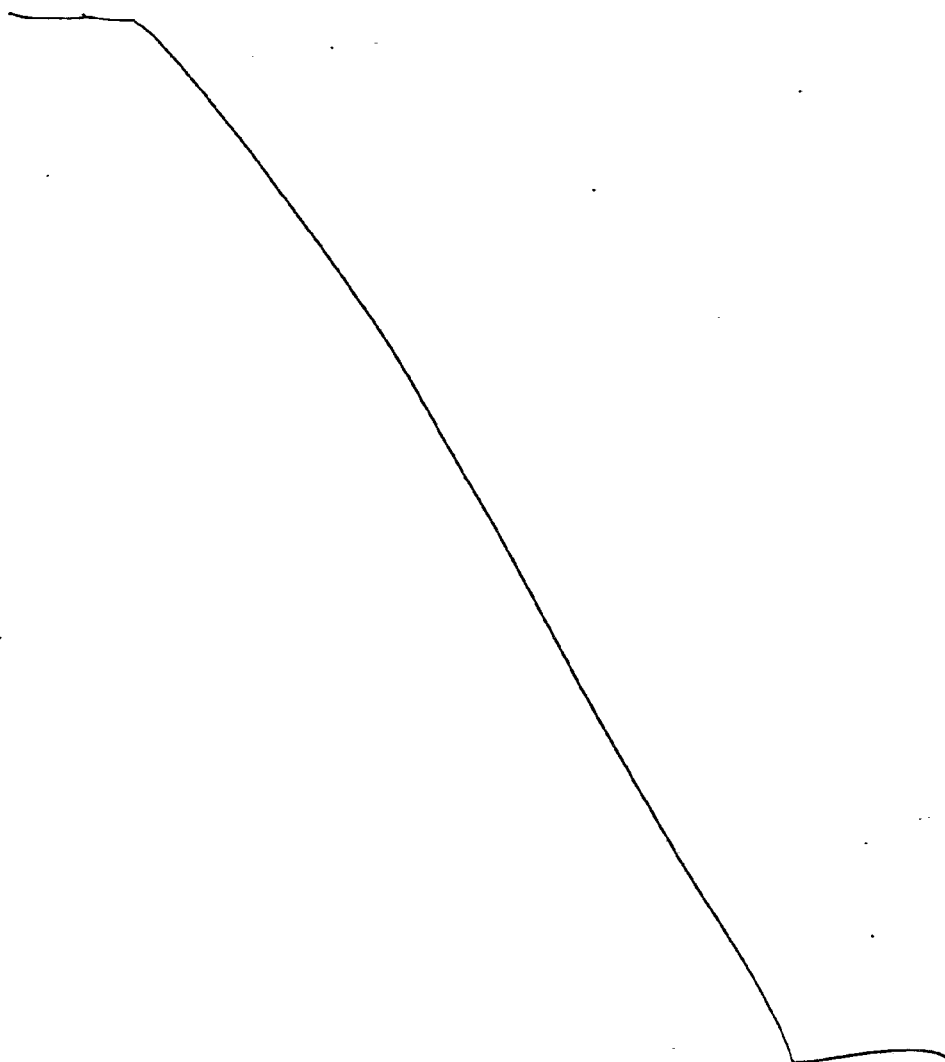
15 Etapa (75) . Reducción catalítica en 5 % p/p de paladio sobre carbón vegetal en metanol conteniendo un equivalente de cloruro de hidrógeno, durante 3 horas.

Etapa (76) . Se prepara por acoplamiento de 16,02 g (43,2 mmoles) de Z-Tyr(Bu^t)-OH y 13,15 g (40 mmoles) de H-D-Phe-MeLeu-OMe.HCl como en la etapa (74) . El producto se purifica por 20 cromatografía en columna de gel de sílice empleando cloroformo y 5% v/v de metanol en cloroformo como disolvente. Rendimiento 60%, aceite, R_fG 0,48, R_fP 0,71, R_fQ 0,73.

25 Etapa (77) . Una solución de 6,52 g (9,76 mmoles) de Z-Tyr(Bu^t)-D-Phe-MeLeu-OMe y 97,6 mmoles de hidrato de hidrazina en 50 ml de metanol, se deja durante la noche a temperatura ambiente. El metanol se separa in vacuo y la hidrazida se cristaliza en metanol/éter, se lava con metanol/agua (1:1 v/v) y éter y se seca. Rendimiento 5,2 g. (80%), p.f. 135°C., R_fD 0,75, R_fE 0,69, R_fF 0,66, R_fH 0,79, R_fQ 0,73.

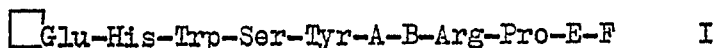
5 Etapas (78) y (79). Como las etapas (60) y (61). Durante el proceso de elaboración el producto precipita del acetato de etilo. Se filtra, se lava con acetato de etilo y éter y se seca. Rendimiento 58,5%, p.f. 145-148°C., R_D 0,72, R_F 0,40, R_H 0,53, R_Q 0,18.

10 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 polipéptidos, de fórmula:

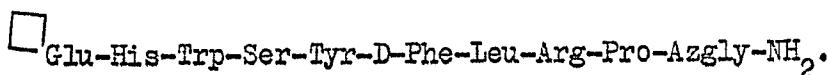


5 en la que A es D-Tyr, D-Tyr(Me), D-Ser, D-Ser(Bu^t), D-Phe, D-Ala ó D-Trp, B es Leu ó MeLeu, E es Azgly y F es un radical amino, o A es Azgly ó Azala, B es Leu, E es un enlace directo y F es un radical etilamino; y sus sales farmacéutica y veterinariamente aceptables de adición de ácido; caracterizado porque comprende:

10 hacer reaccionar Glu-OH, Glu-His-OH, Glu-His-Trp-OH, Glu-His-Trp-Ser-OH, Glu-His-Trp-Ser-Tyr-OH, Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-OH, Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-OH, Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-OH ó Glu-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-OH,

15 o un derivado activado adecuado de cualquiera de éstos, con H-His-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-Trp-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-Ser-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-Tyr-A-B-Arg-Pro-E-F, H-A-B-Arg-Pro-E-F, H-B-Arg-Pro-E-F,
20 H-Arg-Pro-E-F, H-Pro-E-F ó H-Azgly-NH₂, respectivamente, o un derivado activado adecuado de cualquiera de éstos, según una reacción de acoplamiento de péptidos convencional.

25 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como compuesto de fórmula I es



3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque como compuesto de fórmula I es

ME

Glu-His-Trp-Ser-D-Tyr(Me)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂.

4.- Procedimiento para preparar polipéptidos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

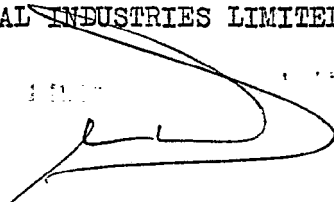
Esta Memoria consta de 40 hojas escritas a máquina por una sola cara.

5

Madrid,

- 8 MAR. 1978

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED



MCE