



ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO	10 AI
	460.618	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	11-7-1977	

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
76/07683	12-7-76	Holanda
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A 61 K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS DE PEPTIDOS"		
71 SOLICITANTE (S)		
AKZO N.V.	(3.01.2 OA/7374-938)	
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
IJssellaan 82, Arnhem, Holanda		
72 INVENTOR (ES)		
Hendrik Marie GREVEN y Prof. Dr. David de WIED		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ	(P-66: 382)	

1

FUNDAMENTOS DE LA INVENCIÓN

## 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de compuestos farmacéuticos, y al subcampo de los compuestos de actividad sicofarmacológica. Los compuestos en cuestión muestran una inhibición de la extinción del comportamiento de evasión condicionada, como resultado de lo cual son eminentemente adecuados para el tratamiento de desórdenes mentales en los que se desea un estímulo de la función cerebral, tal como en el caso de la senilidad. La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos péptidos o sus derivados, si estos últimos son constituyente activo.

## 2. Descripción de la técnica anterior

Por el EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 2, 14 (1967) es sabido que la hormona adrenocorticotrópica (HACT) natural, y más específicamente ciertos fragmentos péptidos de ella, retardan la extinción del llamado "comportamiento de evasión condicionada". En particular, la secuencia de aminoácido 4-10 de la HACT, que contiene péptido, resultó ser el menor fragmento de péptido que era tan activo como la propia HACT en este respecto.

Sin embargo, de la patente de los EE.UU. 3.853.836 parece ser que la secuencia de aminoácido 4-10 completa de la HACT no es esencial para que haya actividad sicofarmacológica, sino que un péptido mucho más corto, concretamente el 4-6 HACT, es responsable de esta actividad. Parece ser además que la L-Met de N-aminoácido terminal se puede reemplazar sin pérdida de actividad por D-Met, L- ó D-Met ( $\rightarrow$ O), L- ó D-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>), desamino-Met, desamino-Met( $\rightarrow$ O), desa-

1 amino-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>), o por el grupo  $\text{H}_2\text{N}-\text{Q}-\text{C}$ , donde Q represen-  
 $\begin{array}{c} \parallel \\ \text{O} \end{array}$   
 ta un resto alcoholideno que tiene de uno a aproximadamente  
 5 seis átomos de carbono, o un resto alcoholeno que tiene de  
 uno a aproximadamente seis átomos de carbono.

Además, se enseña en la patente de los EE.UU.  
 3.856.770 que la sustitución del residuo péptido en C terminal  
 -L-Trp-Gli-OH del péptido 4-10 HACT original, por uno de los  
 grupos consistente en -L-Fen-OH, L-Fen-Gli-OH, un resto fe-  
 10 nilalcoholamino, o un resto (3-indolil)-alcoholamino, tiene  
 como resultado un aumento de la actividad psicofarmacológica.

Se señala además en la patente de los EE.UU. 3.842.064  
 que se obtiene un considerable aumento de actividad psicofar-  
 macológica reemplazando por D-lisina (D-Lis) el aminoácido  
 15 L-arginina (L-Arg) del péptido 4-10 HACT original (o de uno  
 de los péptidos modificados descritos en las memorias des-  
 criptivas de las patentes antes señaladas).

Uno de los péptidos más activos citados en las pa-  
 tentes de los EE.UU. antes indicadas es el péptido represen-  
 20 tado por la abreviatura:

4-9 HACT, 4-L-Met( $\rightarrow$ O), 8-D-Lis, 9-L-Fen  
 péptido que ha sido cambiado, respecto al 4-9 HACT original,  
 según la potenciación indicada en las memorias descriptivas  
 de las patentes, en las posiciones 4, 8 y 9.

25 Este péptido, concretamente  
 H-L-Met( $\rightarrow$ O), -L-Glu-L-His-L-Fen-D-Lis-L-Fen-OH  
 resulta ser aproximadamente 1000 veces más activo que el  
 4-9 HACT sin cambiar.

30 Se ha hallado ahora que el fragmento péptido de es-  
 te 4-9 HACT, 4-L-Met( $\rightarrow$ O), 8-D-Lis, 9-L-Fen, concretamente

1 el fragmento:

L-Fen-D-Lis-L-Fen

también ocasiona por sí mismo alguna actividad sicofarmacológica, aunque en forma latente. En base a la patente de los EE.UU. 3.856.770 y patente de los EE.UU. 3.842.064, se reconoce por los expertos en la técnica que se obtiene (se obtuvo) un péptido muy activo alargando la cadena del péptido L-Fen-D-Lis-L-Fen por el extremo N terminal, por ejemplo con el fragmento de péptido L-Met(→O)-L-Glu-L-His:

10 L-Met(→O)-L-Glu-L-His-L-Fen-D-Lis-L-Fen

Sorprendentemente, también se ha hallado ahora que se pueden obtener péptidos muy activos alargando la cadena por el extremo C terminal del péptido L-Fen-D-Lis-L-Fen. Esta pronunciada potenciación (con un factor de al menos 1000) por alargamiento de la cadena por el extremo C terminal no era de esperar por los expertos en la técnica en base a la información conocida hasta ahora. (Después de todo, se ha mostrado que la prolongación de cadena C terminal del 4-10 o 4-9 HACT original no tenía como resultado ninguna potenciación de efecto en absoluto (véase, p.ej., European Journal of Pharmacology 2, 14 (1967)), mientras que resultó que la prolongación de cadena del péptido 7-9 HACT por el C terminal aumentaba la actividad por un factor de 10 como máximo). Esta sorprendente actividad se puede ilustrar mediante el ejemplo que se da en la tabla siguiente:

TABLA I

<u>Péptido</u>	<u>Relación de potencia respecto a 4-10 HACT</u>
1. Met-Glu-His-Fen-Arg-Trp (4-9 HACT)	1
2. Fen-Arg-Trp (7-9 HACT)	0,1
3. Fen-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis (7-16 HACT)	1

1

<u>Péptido</u>	<u>Relación de potencia respecto a 4-10 HACT</u>
4. Fen-D-Lis-Fen	0,1
5. Fen-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis- -Lis	100

5

10

Además se demostró que el alargamiento de la cadena por el extremo C terminal del anterior péptido I-Fen-D-Lis-I-Fen resultaba tener gran significación, en el sentido de que es esencial una mínima longitud de cadena C terminal. Este mínimo alargamiento de la cadena resultó ser, sorprendentemente, el péptido 10-16 HACT; una longitud de cadena más corta redujo la actividad a un nivel correspondiente al que se ve con 7-16 HACT inalterado.

15

Los autores de la presente invención hallaron además, sorprendentemente, que se podía conseguir una potenciación aún más considerable reemplazando el aminoácido I-Lis (posición 11) del mínimo alargamiento esencial de cadena de C terminal (10-16 HACT) por el aminoácido D-Lis. Esta modificación aumenta la actividad del péptido por un factor adicional de 100. Estos hechos se ilustran claramente por el siguiente ejemplo de la tabla II:

20

TABLA II

<u>Péptido</u>	<u>Relación de potencia respecto a 4-10 HACT</u>
25 1. Fen-Arg-Trp-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis- -Lis (7-16 HACT)	1
2. <u>Fen-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-</u> <u>-Lis</u>	100
3. <u>Fen-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis</u>	1
4. <u>Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-</u> <u>-Lis-Lis</u>	10.000

30

09087

1 El péptido L-Fen-D-Lis-L-Fen, cuya actividad se puede aumen-  
tar sustancialmente, como se ha indicado antes, alargando  
la cadena de C terminal, se puede potenciar más por alar-  
gamiento adicional de la cadena de N terminal, en métodos  
5 descritos en la patente de los EE.UU. 3.853.836, patente de  
los EE.UU. 3.856.770 y patente de los EE.UU. 3.842.064, los  
cuales métodos y longitudes adicionales específicas se in-  
corporan aquí por referencia como si se hubiesen copiado al  
pie de la letra. Los péptidos resultantes demuestran poseer  
10 una actividad sicofarmacológica que es  $10^6$  a  $10^7$  veces más  
fuerte que la del péptido 4-10 HACT original.

Se ha hallado además que el primer aminoácido Fen  
de la L-Fen-D-Lis-L-Fen original no tiene que estar neces-  
ariamente presente, sino que también se puede reemplazar por  
15 numeros aminoácidos distintos, de manera que las ventajas  
primarias de este aminoácido vienen evidentemente de la pre-  
sencia de la longitud adicional de cadena adecuada.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

20 La preparación y aplicación de nuevos compuestos  
biológicamente activos y estables (y derivados funcionales  
de ellos) de fórmula A-L-B-D-Lis-L-Fen-Gli-(L o D)-Lis-L-  
-Pro-L-Val-Gli-L-Lis-L-Lis-X (I)  
donde A es una prolongación de cadena de N terminal elegida  
del grupo que consta de (1) hidrógeno, y (2) radicales N-aci-  
25 lo derivados de (a) ácidos alcohol carboxílicos que tienen  
de uno a aproximadamente seis carbonos, (b) ácidos aralco-  
hilcarboxílicos que tienen de siete a aproximadamente diez  
carbonos, (c) aminoácidos, (d) péptidos, (e) los derivados  
de N-alcoholcarbonilo ó N-aralcoholcarbonilo de los aminoác-  
30 cidos, y (f) los derivados de N-alcoholcarbonilo ó N-aral-

1 cohilcarbonilo de los péptidos; B es un resto de aminoácido  
elegido del grupo que consta de Fen, Trp, Tir y  $-NH-CHR_1-$   
-CO-, donde  $R_1$  es hidrógeno o alcohol de uno a aproximada-  
mente seis carbonos; y X es un miembro elegido del grupo que  
5 consta de hidroxilo, radicales hidroxilo esterificado, ra-  
dicales amino no sustituido y radicales amino sustituido.

Un objeto de la presente invención es preparar es-  
tos compuestos para utilización de sus propiedades sicofar-  
macológicas en el tratamiento de desórdenes mentales en se-  
10 res humanos, cuando se desee el estímulo de la función cere-  
bral, tal como en la senilidad.

Otro objeto de la presente invención es preparar  
composiciones farmacéuticas que tienen uno o más compues-  
tos de fórmula (I), en un vehículo farmacéuticamente acep-  
15 tado, para el tratamiento de desórdenes mentales, cuando se  
desee un estímulo de la función cerebral, tal como en la se-  
nilidad.

#### DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

Entre los ejemplos de  $R_1$  en la anterior fórmula I  
20 se pueden incluir el hidrógeno, metilo, isopropilo, isobu-  
tilo y sec-butilo, por ejemplo.

En la definición de B, los restos de aminoácido  
preferidos son Fen y Ala, estando derivado este último de  
-NH-CHR<sub>1</sub>-CO-, donde  $R_1$  es metilo.

25 En la definición de X en la misma fórmula I, entre  
los ejemplos de un grupo hidroxilo esterificado se pueden  
incluir los ésteres derivados de alcoholes alifáticos tales  
como metanol, etanol, propanol, butanol, hexanol, alcohol  
decílico, alcohol laurílico, alcohol miristílico y alcohol  
30 estearílico. En general, el grupo hidroxilo esterificado

1 tendrá de uno a aproximadamente dieciocho átomos de carbono,  
y preferiblemente de uno a aproximadamente ocho átomos de  
carbono.

5 El grupo amino sustituido mencionado en la defini-  
ción de X comprende un grupo mono- o dialcoholamino en el  
que el grupo alcoholo contiene de uno a aproximadamente seis  
átomos de carbono, tal como metilamino, dimetilamino, dieti-  
lamino, isopropilamino, butilamino, isobutilamino, sec-buti-  
lamino, n-pentilamino y n-hexilamino, pero también comprende  
10 un resto de aminoácido o péptido con la secuencia 17, 17-18,  
17-19, etc, hasta e inclusive 17-24 HACT, o el correspondien-  
te éster de C terminal o amida de los mismos, con la salve-  
dad de que el resto de aminoácido Arg (presente en las posi-  
ciones 17 y 18 del fragmento de HACT) puede estar opcional-  
15 mente reemplazado por Lis.

En la definición de A, el grupo N-acilo se puede  
derivar de cualquier ácido alcoholcarboxílico de uno a apro-  
ximadamente seis átomos de carbono, tal como ácido acético,  
ácido propiónico, ácido valérico y ácido caproico, por ejem-  
20 plo. En una alternativa, A puede ser cualquier grupo acilo  
derivado de un ácido aralcoholcarboxílico, y que tenga de  
siete a aproximadamente diez carbonos, tal como ácido feni-  
lacético, ácido fenilpropiónico y ácido fenilbutírico, por  
ejemplo. Como otra alternativa, el grupo N-acilo se puede  
25 derivar también de un aminoácido o péptido.

Finalmente, A puede ser un derivado de N-alcoholcar-  
bonilo (el alcoholo tiene de uno a aproximadamente seis car-  
bonos) o de N-aralcoholcarbonilo (el aralcoholo tienen de  
siete a aproximadamente diez carbonos) de dicho resto de  
30 aminoácido o dicho resto de péptido.

1

En la anterior fórmula (I), el término

D-Lis-L-Pen-Gli-(L ó D)-Lis-L-Pro-L-Val-Gli-L-Lis-L-Lis

5

se puede denominar en lo sucesivo y en las reivindicaciones "unidad básica omitiendo extensión". En esta unidad básica omitiendo extensión, se observará que hay cuatro unidades de lisina y que, hablando primero del extremo de N terminal, hacia el extremo de C terminal, el primer grupo de lisina ha de estar en su forma D, los grupos tercero y cuarto han de estar en sus formas L, mientras que el segundo grupo, según la presente invención, ha de estar en una forma L o D.

10

La nomenclatura A y B se puede denominar en lo sucesivo "prolongación de cadena de N terminal", mientras que X se puede denominar "prolongación del extremo de C terminal".

15

Los derivados de N-acilo (en la definición de A) que se prefieren se derivan de un aminoácido y péptido, y consisten en uno a tres restos de aminoácido consistentes en el grupo U-Q<sub>1</sub>, U-Q<sub>2</sub>-Q<sub>1</sub> y Q<sub>3</sub>-Q<sub>2</sub>-Q<sub>1</sub>, donde U se elige del grupo que consta de hidrógeno y N-alcoholcarbonilo de uno a aproximadamente seis carbonos o N-aralcoholcarbonilo de siete a aproximadamente diez carbonos; Q<sub>1</sub> se elige del resto de aminoácido consistente en L-His, D-His ó -NH-Z-CO-; Q<sub>2</sub> se elige de los restos de aminoácido consistentes en L-Glu, D-Glu, L-Gln, D-Gln ó -NH-Z-CO-; y Q<sub>3</sub> es el resto ácido U-L-Met, U-L-Met(→O), U-L-Met(→O<sub>2</sub>), U-D-Met, U-D-Met(→O), U-D-Met(→O<sub>2</sub>), desamino-Met, desamino-Met(→O), desamino-Met(→O<sub>2</sub>) ó UNH-Z-CO-, Z representa un resto alcoholeno o alcoholideno no sustituidos, monosustituidos con hidroxilo o monosustituidos con amina, de uno a aproximadamente seis átomos de carbono.

20

25

30

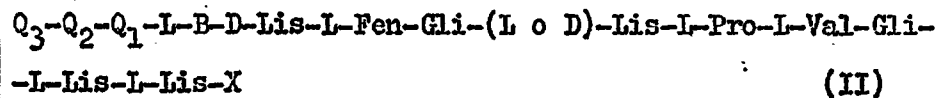
Se estima que los restos de aminoácido tales como Gli, Ala, β-Ala, (α-Me)Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Tr y Lis,

09087

1 pertenecen al resto de aminoácido definido por la fórmula  
-HN-Z-CO-.

5 Los grupos N-acilo que son más preferidos son conforme a la representación esquemática  $Q_3-Q_2-Q_1$ , donde  $Q_3$  se deriva en este caso de metionina o desamino-metionina (por ejemplo L-Met, L-Met( $\rightarrow$ O), L-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>), desamino-Met, desamino-Met( $\rightarrow$ O) y desamino-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>), y donde la secuencia  $-Q_2-Q_1$  representa el resto péptido -Glu-His, o en una alternativa un resto péptido construido con 2 aminoácidos alifáticos naturales, preferiblemente idénticos, tal como -Gli-Gli-, -Val-Val-, -Glu-Ala-, y en particular -Ala-Ala-.

10 Un grupo de péptidos según la fórmula general I que, por tanto, es preferido, puede estar representado por la siguiente fórmula:



o un derivado funcional de ella, donde  $Q_1$ ,  $Q_2$ ,  $Q_3$ , B y X tienen los significados antes asignados.

20 Por derivados funcionales se entiende: (a) sales o sales de adición de ácido de los péptidos según la fórmula general I o II, preferiblemente las sales de metal alcalino y las sales de adición de ácido farmacológicamente aceptables, y (b) complejos metálicos formados poniendo los péptidos aquí mencionados en contacto con una sal, hidróxido  
25 u óxido, insolubles o ligeramente solubles, de un metal (preferiblemente cinc). Naturalmente, por "sales de metal alcalino" se quiere decir las sales de los metales del grupo I de la tabla periódica. Entre las sales de adición de ácido farmacológicamente aceptables se incluyen, por ejemplo, la sal  
30 de HCl, la sal de HBr, sal de ácido fosfórico, sal de áci-

1 do acético, sal de ácido tartárico, sal de ácido cítrico,  
etc.

5 Como se ha indicado antes para los compuestos de  
fórmula I, el grupo hidroxilo esterificado de la definición  
X para los compuestos de fórmula II representa en general un  
éster derivado de alcoholes alifáticos con uno a aproxima-  
damente dieciocho átomos de carbono, y en particular aque-  
llos ésteres derivados de alcoholes alifáticos con uno a  
aproximadamente ocho átomos de carbono, tales como metanol,  
10 etanol, propanol, butanol, etc. El grupo amino sustituido  
mencionado en la definición de X es generalmente un grupo  
amino mono- o disustituido con alcohol, donde el grupo al-  
cohol contiene uno a aproximadamente seis átomos de carbo-  
no, pero también puede ser un resto de aminoácido o péptido  
15 con la secuencia 17, 17-18, 17-19, etc, hasta e inclusive  
17-24 HACT, o el correspondiente éster de C terminal o ami-  
da de los mismos, donde Arg puede estar opcionalmente reem-  
plazado por His. En la definición de B en la fórmula II, los  
restos de aminoácido preferidos son Fen o Ala.

20 Los péptidos y derivados de péptido según la fórmula  
general I (y también para la fórmula II) se preparan de la  
manera usual para tales compuestos. Las maneras más usuales  
para preparar los compuestos de fórmula I y II aquí mencio-  
nados se pueden resumir en dos tipos, como sigue:

25 (a) Condensación, en presencia de un agente de condensación,  
de un compuesto (ácido, péptido, por ejemplo) que posea  
un grupo carboxilo libre, y en el que se hayan protegi-  
do otros grupos reactivos, con un compuesto (aminoácido,  
péptido o amina, por ejemplo) que posea un grupo amino  
30 libre, y en el que, análogamente, se hayan protegido

1 otros grupos reactivos, o

(b) Condensación de un compuesto (ácido, péptido, por ejemplo) que posea un grupo carboxilo activado, y en el que se hayan protegido opcionalmente otros grupos reactivos, con un compuesto (aminoácido, péptido, amina, por ejemplo) que posea un grupo amino libre, y en el que, análogamente, se hayan protegido opcionalmente, tras lo cual los grupos protectores se pueden eliminar, si se desea.

Los métodos más usuales para los dos tipos antes indicados de reacciones de condensación son: el método de la carbodiimida, el método de la azida, el método del anhídrido mixto y el método de los ésteres activados, según se describe en "The Peptides" (Los péptidos), volumen I, 1965 (Academic Press), E. Schröder y K. Mübke, aquí incorporado como si se hubiera escrito al pie de la letra. El llamado método "en fase sólida", de Merrifield, descrito en J. Am. Chem. Soc. 85, 2149 (1963), e incorporado aquí, se puede usar también para la preparación de los péptidos o derivados de péptido de las fórmulas I y II aquí mencionadas. Como lo indican esas referencias, entre las maneras de activar el grupo carboxilo se incluyen la conversión del grupo carboxilo a un haluro de ácido, una azida, anhídrido, imidazolina o un éster activado (tal como el éster de N-hidroxisuccinimida o éster de p-nitrofenilo). Análogamente, estas referencias muestran que el grupo amino se puede activar por conversión del mismo en una fosfinamida, o por uso del método "fosforazo". Como se muestra en las referencias citadas, y como será apreciado por los expertos en la técnica, los grupos reactivos cuya participación en la reacción de condensación se ha de impedir se protegen eficazmente con

1 los llamados grupos protectores, que a su vez se pueden  
eliminar fácilmente por hidrólisis o reducción. Un grupo  
carboxilo se puede proteger eficazmente, por ejemplo, por  
esterificación con, por ejemplo, metanol, etanol, butanol  
5 terciario, alcohol bencílico o alcohol p-nitrobencílico, o  
por conversión a una amida. Sin embargo, esta última es muy  
difícil de eliminar, de manera que es recomendable el uso  
de este grupo solo para protección del grupo carboxilo del  
aminoácido de C terminal del péptido final, o el grupo  $\delta$ -  
10 -carboxilo del ácido glutámico. En este caso, la síntesis  
del péptido conduce directamente a la amida del péptido,  
según las fórmulas I o II.

Los grupos que pueden proteger eficazmente a un  
grupo amino son generalmente grupos ácido, por ejemplo un  
15 grupo ácido derivado de (a) un ácido carboxílico alifático,  
aromático, aralifático o heterocíclico, tal como un grupo  
acétilo, benzilo o piridinocarboxilo, (b) un grupo ácido  
derivado de ácido carbónico, tal como un grupo etoxicarbo-  
nilo, benciloxicarbonilo, t-butiloxicarbonilo o p-metoxiben-  
20 ciloxicarbonilo, o (c) un grupo ácido derivado de un ácido  
sulfónico, tal como bencenosulfonilo o p-toluensulfonilo.

También se pueden usar otros grupos, tales como  
grupos arilo o aralcoholo sustituidos o no sustituidos, por  
ejemplo bencilo o trifenilmetilo, o grupos tales como o-ni-  
25 trofenilsulfenilo y 2-benzoil-1-metilvinilo.

Se recomienda mucho proteger también el grupo  $\epsilon$ -ami-  
no de la lisina, el grupo  $\gamma$ -carboxilo de Glu y, si se de-  
sea, el grupo imidazol de la histidina. Los grupos protecto-  
res usuales en relación con esto son un grupo tere-butilo-  
30 xicarbonilo o un tosilo, para el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisi-

1 na, un grupo terc-butiloxycarbonilo para Glu, y un grupo bencilo o tritilo para His.

5 Los grupos protectores se pueden escindir por diversos métodos usuales conocidos por los expertos en la técnica, dependiendo de la naturaleza del grupo en cuestión, por ejemplo con ayuda de ácido trifluoroacético, o por reducción suave, por ejemplo con hidrógeno y un catalizador tal como paladio, o con HBr en ácido acético glacial.

10 Entre las maneras de preparar péptidos según la presente invención, en los que el resto con N terminal es (L ó D)Met( $\rightarrow$ O) o desamino-Met( $\rightarrow$ O), se pueden incluir la oxidación suave, de manera conocida, del correspondiente péptido de Met o desamino-Met, por ejemplo con peróxido de hidrógeno o un perácido diluidos. Tal oxidación da una mezcla del S- y R-sulfóxido, que se ha de resolver en los diastereoisómeros separados por un método conocido, por ejemplo por cristalización selectiva. Por copulación de S-(ó R)-sulfóxido de (L ó D)-metionina, o su correspondiente derivado desamino, con el resto del fragmento de péptido, también  
15 se pueden obtener directamente los diastereoisómeros separados.

20 Los péptidos según la presente invención que tienen (L ó D)-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>) ó desamino-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>) como resto de N terminal, se pueden obtener por oxidación del (desamino)-  
25 -Met-péptido I, o por copulación de Met- ó desamino-Met-sulfona con el resto del fragmento de péptido.

Las sales de adición de ácido se obtienen por reacción de los péptidos aquí mencionados con un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como un haluro de hidrógeno, ácido forfórico, ácido acético, ácido tartárico o ácido

1 cítrico.

Los péptidos según la invención, y los derivados antes definidos, se pueden administrar tanto por vía oral como parenteral. Para fines de administración parenteral los péptidos se disuelven, suspenden o emulsifican en un fluido adecuado. Cuando se mezclan con excipientes o cargas adecuados, se pueden tratar para darlos una forma adecuada para administración oral, tal como píldoras, tabletas o grageas. Los péptidos aquí mencionados se pueden administrar también en forma de supositorio o pulverización. Se prefiere la forma de administración oral. Entre los ejemplos de fluidos adecuados para administración parenteral se incluyen agua esterilizada, hecha isotónica y opcionalmente tamponizada a aproximadamente  $\text{pH} = 4$ , o aceites, tal como aceite de cacahuete. Son ejemplos de excipientes y cargas adecuados la lactosa, manita, almidón, estearato de magnesio, etc.

Los péptidos o derivados de péptido según la invención se usan preferiblemente por vía parenteral, en dosis de aproximadamente  $0,1 \mu\text{g}$  a  $1 \mu\text{g}$  por kg de peso del cuerpo por día, y oralmente de aproximadamente  $1 \mu\text{g}$  a  $1 \text{mg}$  por kg de peso del cuerpo por día, dependiendo del nivel de actividad de los péptidos.

Se obtienen preparaciones particularmente valiosas si los péptidos aquí mencionados se incorporan en una forma en la que den una actividad prolongada, es decir, en las llamadas "cápsulas de tiempo". Los complejos metálicos de los péptidos son específicamente adecuados para provocar esta actividad prolongada. Estos complejos metálicos se pueden obtener poniendo los péptidos en contacto con sales metálicas, hidróxidos metálicos u óxidos metálicos poco solubles.

1 Los metales que se pueden usar en este procedimiento son  
aquellos metales que pertenecen al período 4 de la tabla  
periódica, en los "grupos b" (elementos de transición), por  
ejemplo cobalto, níquel, cobre, hierro y (preferiblemente)  
5 cinc, igual que los metales que pertenecen a los "grupos a"  
del periodo 3 de la tabla periódica y que son capaces de  
formar complejos, tal como magnesio y aluminio. La prepara-  
ción de esos complejos metálicos tiene lugar de maneras co-  
nocidas por los expertos en la técnica.

10 Como sales metálicas poco solubles se emplean pre-  
feriblemente fosfatos metálicos, pirofosfatos metálicos y  
polifosfatos metálicos. Se puede obtener un complejo metáli-  
co, por ejemplo, añadiendo el péptido y un exceso molar de  
una sal metálica, hidróxido metálico u óxido metálico, poco  
15 solubles, a un medio acuoso. El complejo metálico se puede  
obtener también añadiendo un medio alcalino a una solución  
acuosa del péptido y un exceso molar de la sal metálica so-  
luble, teniendo como resultado la formación del complejo  
insoluble péptido-hidróxido metálico. El complejo metálico  
20 se puede obtener además añadiendo el péptido, un exceso de  
una sal metálica soluble y una sal soluble (no una sal "me-  
tálica" según se ha definido antes) a un medio acuoso, pre-  
feriblemente alcalino, como resultado de lo cual se forma  
in situ un complejo insoluble de péptido-sal metálica. Los  
25 complejos metálicos se pueden usar directamente como suspen-  
siones, o bien, por ejemplo, se pueden liofilizar y volver  
a suspender de nuevo más tarde.

Las siguientes observaciones se hacen respecto a  
toda la memoria descriptiva, y en particular a los ejemplos,  
30 las reivindicaciones adjuntas a la presente, y respecto a

1 las anteriores tablas I y II:

1. Si no se da configuración óptica, se trata de la forma L.

2. Se han asignado las siguientes abreviaturas a los grupos protectores o activadores usados:

Boc = terc-butiloxicarbonilo

tBu = butilo terciario

Me = metilo

ONF = p-nitrofeniloxi

10 Bcl = bencilo

ONB = nitrobenciloxi

OSu = succinimido-N-oxi

Z = benciloxicarbonilo

3. Las siguientes abreviaturas se han asignado a los disolventes o reactivos usados:

15 Bc = benceno

To = tolueno

EtOH = etanol

Bu = butanol

20 Pi = piridina

Ac = ácido acético

EtOAc = acetato de etilo

Agua = agua

Am = alcohol amílico

25 iPro = isopropanol

DMF = dimetilformamida

THF = tetrahidrofurano

DCCI = dicitclohexilcarbodiimida

DCEU = dicitclohexilurea

30 TAA = trietilamina

1	ATF	= ácido trifluoroacético
	HOObt	= 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazina
	NEM	= N-etilmorfolina
	HOEt	= N-hidroxibenzotriazol

5 4. Las siguientes abreviaturas se han usado para los grupos aminoácido:

	Met	= metionilo
	Met( $\rightarrow$ O)	= sulfóxido de metionilo
	Met( $\rightarrow$ O <sub>2</sub> )	= sulfona de metionilo
10	Glu o Gln	= glutamilo (ácido glutámico) o glutaminilo, respectivamente
	Ser	= serilo
	His	= histidilo
	Pen	= fenilalanilo
15	Arg	= arginilo
	Lis	= lisilo
	Trp	= triptofilo
	Gli	= glicilo
	Val	= valilo
20	Leu	= leucilo
	Ala	= alanilo
	Ile o Ileu	= isoleucilo
	$\beta$ -Ala	= $\beta$ -alanilo
25	( $\alpha$ -Me)- Ala	= $\alpha$ -metilalanilo
	Pro	= prolilo
	Tir	= tirosilo
	Tr	= treonilo

30 5. Las siguientes abreviaturas se han usado para grupos relacionados con restos de aminoácido:

- 1 desamino-Met = desamino-metionilo  
 desamino-Met( $\rightarrow$ 0) = sulfóxido de desamino-metionilo  
 (ó 4-metilsulfinilbutirilo)  
 desamino-Met( $\rightarrow$ 0<sub>2</sub>) = sulfona de desamino-metionilo (ó  
 5 4-metilsulfonilbutirilo)

Preparación de materiales de partida

A. Los péptidos de las fórmulas estructurales dadas a continuación se conocen por las patentes de los EE.UU. 3.853.836, 3.856.770 y 3.842.064, cuyas enseñanzas se incorporan aquí por referencia.

10

1. Boc-Met-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,39 (SiO<sub>2</sub>)

2. Boc-Met( $\rightarrow$ 0<sub>2</sub>)-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,36

15

3. Boc-Val-D-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,33

4. Boc-Gli-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,32

5. Boc-D-Met-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

20

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,37

6. Boc- -Ala-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,42

7. Boc-( -Me)Ala-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,31

25

8. Boc-Ala-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,33

9. Boc-Met-Glu(OtBu)-D-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,35

10. Boc-Val-Glu(OtBu)-D-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,32

30

09087

11. Boc-Met-Gln-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,28

12. Desamino-Met-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Bu:Ac:agua (4:1:1) = 0,52

13. Desamino-Met-Glu(OtBu)-D-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Bu:Ac:agua (4:1:1) = 0,50

14. Boc-Met-Ala-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>

(a) Boc-Ala-Ala-OMe: se disuelven 20,79 g de Boc-Ala-  
-OH en 150 ml de DMF. Tras enfriar a -10°C se añaden 15,84 ml de TAA seguidos por 10,45 ml de cloroformiato de etilo. La mezcla se agita a -10°C durante 10 minutos, tras lo cual se añade gota a gota una solución de 13,9 g de H-Ala-OMe-HCl en 150 ml de DMF y 14,4 ml de TAA. La mezcla de reacción se agita ahora por medios mecánicos adecuados durante 15 minutos a -10°C, 2 horas a 0°C y finalmente durante 8 horas a temperatura ambiente. Tras enfriar a -10°C, se separa por filtración el TAA-HCl y el filtrado se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en 250 ml de acetato de etilo, y se lava consecutivamente con agua, HCl (0,05N), solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5%) y solución de NaCl (30%). Tras secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el filtrado se evapora a sequedad, y el residuo se cristaliza con éter/éter de petróleo. Rendimiento 19,3 g; punto de fusión 108/110°C. Rf en To:EtOH (8:2) = 0,50 sobre SiO<sub>2</sub>.

(b) (b) H-Ala-Ala-OMe.HCl: se disuelven 18,75 g de Boc-Ala-Ala-OMe (de (a)) en 150 ml de cloruro de metileno, y se pasa HCl por la solución durante

1  
45 minutos, durante el cual tiempo se mantiene fresco en agua de hielo. Rendimiento del producto desprotegido: 14,3 g.

5 Rf en To:EtOH (8:2) = 0,01 sobre SiO<sub>2</sub>.

10 (c) Boc-Het-Ala-Ala-OMe: 15,8 g de Boc-Met-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>, disueltos en 150 ml de DMF, se activan a -20°C con 28,0 ml de HCl 4,2N en THF, y 8,10 ml de nitrato de isoamilo. Tras 20 minutos de activación a -15°C, la solución se neutraliza con 14,5 ml de NEM, tras lo que se añade una solución de 14,3 g de H-Ala-Ala-OMe.HCl (de (b)) en 75 ml de DMF y 1 eq. de NEM. Tras haber ajustado el pH a 7,2 con NEM, la mezcla de reacción se mantiene a aproximadamente 4°C durante 48 horas. Luego se separa por filtración el NEM.HCl y el filtrado se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en 300 ml de acetato de etilo y se lava con agua, HCl 0,05N, NaHCO<sub>3</sub> al 5%, y finalmente agua de nuevo.

15  
20 Tras secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el filtrado se evapora a sequedad y el residuo se cristaliza con acetato de etilo:éter de petróleo (1:1). Rendimiento 16,2 g; punto de fusión 128-129°C. Rf en To: EtOH (8:2) = 0,46 sobre SiO<sub>2</sub>.

25 (d) Boc-Met-Ala-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>: se disuelven 15,9 g de Boc-Met-Ala-Ala-OMe de (c) en 160 ml de metanol, y se añaden 16,0 ml de hidrato de hidrazina. Tras agitar durante 3,5 horas se añaden 200 ml de éter seco. Tras enfriar a 0°C, la sustancia sólida se separa por filtración. Rendimiento 12,6 g; punto de fusión 207-208°C. Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,41 sobre SiO<sub>2</sub>.

Los siguientes péptidos se preparan de manera correspondiente a la indicada en 14:

15. Boc-Ala-Ala-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,44

16. Boc-Val-Ala-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,40

17. Boc-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>)-Glu-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,37

18. Boc-Met-Glu(OtBu)-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

(a) Z-Glu-OtBu-Ala-OMe: una solución de 3,37 g de Z-Glu-(OtBu)OH en 30 ml de acetonitrilo se añade a 0°C a una suspensión de 1,40 g de H-Ala-OMe.HCl en 15 ml de acetonitrilo, tras lo cual se añade 1 equivalente de TAA seguido por una solución de 2 g de DCCI en 20 ml de acetonitrilo, a -10°C. Tras agitar durante 30 minutos a -10°C, la mezcla de reacción se agita subsiguientemente durante otras 12 horas a temperatura ambiente. Luego se añaden 30 ml de agua, se separa por filtración la DCHU formada, y el filtrado se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en 100 ml de acetato de etilo, y subsiguientemente se lava con H<sub>2</sub>O, solución de NaHCO<sub>3</sub> al 5%, solución de NaCl al 30% y agua. Tras secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el filtrado se evapora a sequedad. Rf en Am:Pi:agua (5:3:2) = 0,89 sobre SiO<sub>2</sub>.

(b) H-Glu(OtBu)-Ala-OMe.HCl: se disuelven 2,53 g de Z-Glu(OtBu)-Ala-OMe (de (a)) en 30 ml de metanol. Tras adición de 3,4 ml de HCl 2N y 700 mg de Pd/C, se pasa hidrógeno a través de la mezcla de reacción durante 2,5 horas (hasta que cesa el desprendimiento

1

de  $\text{CO}_2$ ). El catalizador se separa por filtración sobre Hyflo suministrado por Mansville Company, y el filtrado se evapora a sequedad.

Rendimiento: 1,95 g

5

Rf en Am:Pi:agua (5:3:2) = 0,71 sobre  $\text{SiO}_2$ .

(c) Boc-Met-Glu(OtBu)-Ala-OMe: este péptido protegido se prepara de manera correspondiente a la descrita en 14 (c). Rendimiento 90%, punto de fusión 103-106 °C.

10

Rf en Am:Pi:agua (5:3:2) = 0,95 sobre  $\text{SiO}_2$ .

(d) Boc-Met-Glu(OtBu)-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>: Método correspondiente al de 14 (d).

Rendimiento 74,9%

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,70 sobre  $\text{SiO}_2$ .

15

19. Boc-Met-Lis(Boc)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>

(a) Z-Lis(Boc)-His-OMe: se disuelven 22,8 g de Z-Lis(Boc)-

-OH en 200 ml de DMF, tras lo cual se añaden 8,11 g de HOBT. La mezcla se enfría a -22°C, tras lo cual se añade consecutivamente lo siguiente a -22°C:

20

una solución de 14,52 g de H-His-OMe.2HCl en 200 ml de DMF, 2 eq. de TAA y 12,36 g de DCCI. Tras agitar durante 20 minutos a -22°C, 2 horas a 0°C y 16 horas a temperatura ambiente, se separan por filtración DCHU y TAA.HCl, y el filtrado se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en acetato de etilo

25

y se lava con agua, solución de  $\text{NaHCO}_3$  (5%) y finalmente con agua de nuevo. Tras secar sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , la solución se evapora a pequeño volumen. Se añade éter, y la sustancia se separa por cristalización. Rendimiento 19,2 g; punto de fusión 138-140°C.

30

Rf en To:EtOH (8:2) = 0,35 sobre SiO<sub>2</sub>.

(b) H-Lis(Boc)-His-OMe-HCl: se disuelven 19 g de Z-Lis(Boc)-His-OMe en 210 ml de DMF y 2 eq. de HCl/DMF. Tras adición de Pd/C se pasa hidrógeno durante 3 horas. El catalizador se separa por filtración, y el filtrado se reduce a un volumen de aproximadamente 100 ml por evaporación. Rf en Am:Pi:agua (5:3:2) = 0,38 sobre SiO<sub>2</sub>.

(c) Boc-Met-Lis(Boc)-His-OMe: el método es análogo al del ejemplo 14 (c).

Rf en Am:Pi:agua (5:3:2) = 0,24 sobre SiO<sub>2</sub>

(d) Boc-Met-Lis(Boc)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>: el método es análogo al del ejemplo 14 (d)

Rf en Am:iPro:agua (100:40:50) = 0,42 sobre SiO<sub>2</sub>.

Los siguientes compuestos se preparan también de manera análoga:

20. Desamino-Met-Ala-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,34 sobre SiO<sub>2</sub>.

21. Boc-Leu-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,31 sobre SiO<sub>2</sub>.

22. Boc-Met-Ser-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,28 sobre SiO<sub>2</sub>.

23. Boc-Ala-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>:

Rf en Am:iPro:agua (10:4:5) = 0,47 sobre SiO<sub>2</sub>.

B. Síntesis de H-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH y análogos

101. H-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH

(a) Z-Fen-D-Lis(Boc)-OMe: se disuelven 29,9 g de Z-Fen-OH y 14,8 g de HOBT en 200 ml de DMF.

Tras enfriar a -22°C, se añade consecutivamente lo siguiente: (1) una solución de 32,6 g de

1 H-D-Lis(Boc)-OMe.HCl en 210 ml de DMF y 1 eq.  
de TAA, y (2) una solución de 22,7 g de DCCI  
en 100 ml de DMF. La totalidad se agita subsi-  
guientemente por medios mecánicos adecuados du-  
5 rante 15 minutos a  $-22^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas a  $0^{\circ}\text{C}$   
y durante aproximadamente 16 horas a temperatu-  
ra ambiente.

La mezcla se enfría a  $-20^{\circ}\text{C}$ , tras lo cual la  
DCHU formada se separa por filtración, y el fil-  
10 trado se evapora a sequedad. El residuo se disuel-  
ve en acetato de etilo y se lava con agua, solu-  
ción de ácido cítrico al 5%, solución de  $\text{NaHCO}_3$   
al 5%, y de nuevo agua, tras lo cual la solución  
se evapora a sequedad. El residuo se cristaliza  
15 en éter diisopropílico/éter (1:5).

Rendimiento: 51,6 g; punto de fusión  $122/123^{\circ}\text{C}$ .  
Rf en To:EtOH (8:2) = 0,60 sobre  $\text{SiO}_2$ .

(b) Z-Fen-D-Lis(Boc)-OH: se disuelven 13,7 g de Z-  
-Fen-D-Lis(Boc)-OMe de (a) en 180 ml de dioxano/  
20  $\text{H}_2\text{O}$  (9:1). Tras adición de 15 ml de NaOH 2N, la  
mezcla de reacción se agita durante 2 horas a  
temperatura ambiente, y luego se ajusta el pH  
a 7 con HCl 1N. La mezcla de reacción se reduce  
subsiguientemente en volumen a aproximadamente  
25 50 ml (exentos de dioxano) por evaporación, y  
se añaden 250 ml de acetato de etilo. La mezcla  
se lava con agua y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
se separa por filtración, y el filtrado se  
evapora a sequedad, tras lo cual se cristaliza  
30 el residuo en éter/éter de petróleo (1:2). Ren-

1 dimiento: 11,3 g; punto de fusión 72/75°C.

Rf en To:EtOH (8:2) = 0,12 sobre SiO<sub>2</sub>;

Rf en Am:Pi:agua (5:3:2) = 0,69 sobre SiO<sub>2</sub>.

5 (c) Boc-Fen-Gli-OBcl: se añade 1 eq. de NEM a una solución de 12,6 g de H-Gli-OBcl.HCl en 100 ml de DMF, seguido por una solución de 25,5 g de Boc-Fen-ONF en 100 ml de DMF. Tras agitar durante la noche a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en 300 ml de acetato de etilo/agua (5:1), y la solución resultante se lava con agua.

10 Tras secar sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el volumen del filtrado se reduce a aproximadamente 100 ml por evaporación; se añaden subsiguientemente 50 ml de éter de petróleo y 250 ml de éter seco. Rendimiento 16,7 g; punto de fusión 126-127°C.

15 Rf en To:EtOH (8:2) = 0,56 sobre SiO<sub>2</sub>.

20 (d) H-Fen-Gli-OBcl.HCl: se disuelven 8,25 g de Boc-Fen-Gli-OBcl en 120 ml de cloruro de metileno, y se pasa HCl gaseoso con agitación y enfriamiento (agua de hielo) durante 1 hora.

La introducción de HCl se detiene tras 1 hora, y la mezcla de reacción se evapora a sequedad. Rendimiento 6,98 g de un producto tipo espuma.

25 Rf en To:EtOH (8:2) = 0,33 sobre SiO<sub>2</sub>.

(e) Z-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OBcl: el método es análogo al método descrito en (a). Reactivos necesarios: 9,25 g de Z-Fen-D-Lis(Boc)-OH (de (b)), 2,92 g de HOBt, 6,98 g de H-Fen-Gli-OBcl.HCl y 4,12 g de DCCI. Cristalización en: acetato de

30

09087

1 etilo/éter de petróleo.

Rendimiento: 12,0 g; punto de fusión 157-159°C.

5 (f) H-Pen-D-Lis(Boc)-Pen-Gli-OH: se disuelven 4,11 g de Z-Pen-D-Lis(Boc)-Pen-Gli-OBcl en 75 ml de DMF. Tras adición de Pd/C se pasa hidrógeno por la mezcla durante 3 horas. El catalizador se separa por filtración sobre hyflo/amiante, y el filtrado se evapora a sequedad. Rendimiento: 2,9 g. Rf en Bu:Pi:Ac:agua (4:0,75:0,25:1) = 0,46 sobre SiO<sub>2</sub>.

10 Los siguientes péptidos se prepararon bajo condiciones y de manera idénticas a las dadas en el presente ejemplo 101:

15 102. H-Trp-D-Lis(Boc)-Pen-Gli-OH:

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (4:0,75:0,25:1) = 0,52 sobre SiO<sub>2</sub>

103. H-Leu-D-Lis(Boc)-Pen-Gli-OH:

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (4:0,75:0,25:1) = 0,40 sobre SiO<sub>2</sub>

104. H-Val-D-Lis(Boc)-Pen-Gli-OH:

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (4:0,75:0,25:1) = 0,42 sobre SiO<sub>2</sub>

20 105. H-Ala-D-Lis(Boc)-Pen-Gli-OH:

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (4:0,75:0,25:1) = 0,37 sobre SiO<sub>2</sub>

106. H-Tir-D-Lis(Boc)-Pen-Gli-OH:

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (4:0,75:0,25:1) = 0,48 sobre SiO<sub>2</sub>

25 C. Síntesis de N-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-OH

y análogos

201. H-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)OMe (11-16

HACT); C.A. 72, 13055 (1970);

202. H-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-NH<sub>2</sub> (11-16

HACT-amida); C.A. 72, 13055 (1970);

1

203. H-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-Arg-Arg-  
-Pro-NH<sub>2</sub> (11-19 HACT-amida); C.A. 63, 16405a (1965);

5

204. H-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-Arg-Arg-  
-Pro-Val-Lis(Boc)-Val-Tir-Pro-OtBu: Helv. 44, 1136  
 (1961);

10

205. H-D-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-NH<sub>2</sub>:

(a) H-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-NH<sub>2</sub>: se disuel-  
 ven 8,61 g de Z-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-  
 -NH<sub>2</sub> en 110 ml de metanol. Tras adición de Pd/C,  
 se pasa hidrógeno a la mezcla durante 3 horas.  
 El catalizador se separa por filtración sobre  
 hyflo, y el filtrado se evapora a sequedad. Ren-  
 dimiento: 7,27 g.

15

Rf en Am:Pi:agua (5:3:2) = 0,36 sobre SiO<sub>2</sub>.

(b) Z-D-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-NH<sub>2</sub>:  
 se disuelven 4,18 g de Z-D-Lis(Boc)-OH y 1,62 g  
 de HOBt en 30 ml de DMF.

20

Tras enfriar esta solución a -22°C, se añade  
 una solución de 7,26 g de H-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-  
 -Lis(Boc)-OMe (de (a)) en 30 ml de DMF, seguido  
 por 2,47 g de DCCI. Tras agitar durante 15 minu-  
 tos a -22°C, 2 horas a 0°C y 16 horas a tempera-  
 tura ambiente, la DCHU formada se separa por fil-  
 tración, y el filtrado se evapora a sequedad.

25

El residuo se disuelve en acetato de etilo y  
 se lava consecutivamente con solución de ácido  
 cítrico, solución de NaHCO<sub>3</sub> (5%) y solución de  
 NaCl (30%), tras lo cual se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
 La solución se evapora a sequedad, y el residuo  
 se cristaliza en acetato de etilo.

30

09087

1 Rendimiento: 9,1 g; punto de fusión 114-119°C.

Rf en To:EtOH (8:2) = 0,20 sobre SiO<sub>2</sub>.

(c) H-D-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-NH<sub>2</sub>:

5 se disuelven en 50 ml de metanol 3,68 g del péptido protegido obtenido en (b).

Tras adición de Pd/C, se pasa hidrógeno durante 4 horas. Luego se separa el catalizador por filtración sobre hyflo, y el filtrado se evapora a sequedad. Rendimiento: 3,2 g;

10 Rf en Bu:Ac:agua (10:1:3) = 0,56 sobre SiO<sub>2</sub>.

Disolviendo este producto en una solución metanólica de HCl se obtiene la correspondiente sal de HCl de péptido.

15 206. H-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-OH

Obtenido por hidrólisis alcalina del correspondiente éster metílico, descrito en 201.

D. Síntesis de péptidos obtenidos por acoplamiento de péptidos indicados en (A.) con péptidos indicados en (B.), mediante el método de la azida.

20 301. Boc-Met-Ala-Ala-Ala-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (14 y 105)

25 Se disuelven 1,62 g de Boc-Met-Ala-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> en 20 ml de DMF. Tras enfriar la solución a -20°C se añaden 1,68 ml de HCl 4,74N/THF, seguidos por 0,60 ml de nitrito de isoamilo. Tras agitar durante 20 minutos a -15°C se añaden 0,6 ml de NEM, una solución de 2,3 g de H-Ala-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH en 20 ml de DMF y 1,68 ml de HCl 4,74N/THF. El pH de la mezcla de reacción se ajusta a 7,2 con NEM, tras lo cual se mantiene a aproximadamente 4°C durante 2 días. Luego se separa por filtración la NEM.HCl, y el filtrado

30

1 se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en  
 125 ml de sec-butanol/ $\text{CHCl}_3$  (2:3) y 25 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ,  
 tras lo cual se lava consecutivamente con agua, so-  
 5 lución de ácido cítrico al 5% y de nuevo con agua.  
 Tras secar sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , el filtrado se evapora a  
 sequedad. El residuo se disuelve en 40 ml de meta-  
 nol, a los que se añaden luego 160 ml de agua, tras  
 lo cual la sustancia sólida se separa por filtrre-  
 ción y se seca.

10 Rendimiento: 2,6 g;

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (4:0,75:0,25:1) = 0,62 sobre  
 $\text{SiO}_2$ ; punto de fusión 202-203°C con descomposición.

Los siguientes péptidos se preparan bajo las mis-  
 mas condiciones que en 301.

15 302. Boc-Met-Ala-Ala-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (14 y 101)

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (4:0,75:0,25:1) = 0,63 sobre  
 $\text{SiO}_2$ ; punto de fusión 215-216°C (descomposición).

303. Boc-Ala-Ala-Ala-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (15 y 101)

20 Rf = 0,59

304. Boc-Val-Ala-Ala-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (16 y 101)

Rf = 0,61

305. Boc-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>)-Gli-Ala-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH  
 (17 y 101)

25 Rf = 0,49

306. Boc-Met-Glu(OtBu)-Ala-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (18  
 y 101)

Rf = 0,64

307. Desemino-Met-Ala-Ala-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (20  
 y 101)

30 Rf = 0,67

09087

1 308. Boc-Ala-Ala-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (23 y 101)

Rf = 0,50

309. Boc-Ala-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH

Rf = 0,51

5 310. Boc-Met-Glu(OtBu)-Ala-Ala-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (18 y 105)

Rf = 0,64

10 311. Boc-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>)-Glu(OtBu)-His-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (2 y 101)

15 Se disuelven 2,98 g de Boc-Met( $\rightarrow$ O<sub>2</sub>)-Glu(OtBu)-His-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> (4,82 mmoles) en 20 ml de DMF, y la solución se enfría a 0°C, tras lo cual se añaden 2,65 ml de HCl 5,46N/THF a la solución enfriada. Luego se agita la mezcla de reacción durante un rato, tras lo cual se enfría más, hasta -20°C, y se añaden 0,66 ml de nitrito de isoamilo. La mezcla se agita durante 20 minutos a aproximadamente -15°C, tras lo cual se sigue el mismo procedimiento descrito en 301.

20 Los siguientes péptidos se preparan de manera correspondiente a la descrita en 311:

312. Boc-Met-Glu(OtBu)-His-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (1 y 101);

Rf = 0,69

25 313. Boc-Met-Glu(OtBu)-D-His-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (9 y 101);

Rf = 0,71

30 314. Boc-Val-D-Glu(OtBu)-His-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (3 y 101);

Rf = 0,65

- 1 315. Boc-Gli-Glu(OtBu)-His-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (4  
y 101);  
Rf = 0,60
- 5 316. Boc-D-Met-Glu(OtBu)-His-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH  
(5 y 101);  
Rf = 0,68
- 10 317. Boc-β-Ala-Glu(OtBu)-His-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH  
(6 y 101);  
Rf = 0,62
- 15 318. Boc-(α-Met)Ala-Glu(OtBu)-His-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-  
-Gli-OH (7 y 101);  
Rf = 0,60
319. Boc-Val-Glu(OtBu)-D-His-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH  
(10 y 101);  
Rf = 0,64
- 20 320. Boc-Met-Gln-His-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (11 y 101);  
Rf = 0,75
321. Desamino-Met-Glu(OtBu)-His-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH  
(12 y 101);  
Rf = 0,58
- 25 322. Boc-Met-Glu(OtBu)-His-Trp-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (1  
y 102);  
Rf = 0,70
323. Boc-Met-Glu(OtBu)-His-Leu-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (1  
y 103);  
Rf = 0,65
- 30 324. Boc-Met-Glu(OtBu)-His-Val-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (1  
y 104);  
Rf = 0,70

1

325. Boc-Leu-Glu(OtBu)-His-Leu-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (21 y 103);

Rf = 0,66

5

326. Boc-Met-Ser-His-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (22 y 101)

Rf = 0,76

327. Boc-Met-Lis(Boc)-His-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (19 y 101);

Rf = 0,69

10

328. N-acetil-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH

(se prepara N-acetil-Met-Ala-Ala-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> bajo las mismas condiciones y de la manera descrita en 14, con la salvedad de que en este caso se usa N-acetil-Met-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> en vez de Boc-Met-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>).

Rf = 0,55

15

329. Boc-Met-Glu(OtBu)-His-Thr-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (1 y 106);

Rf = 0,75

20

Los valores de Rf de los péptidos antes citados son válidos para SiO<sub>2</sub>, con Bu:Pi:Ac:agua (4:0,75:0,25:1) como eluyente.

25

Aunque la invención se ha descrito con referencia a las anteriores realizaciones específicas, numerosas variaciones y modificaciones serán evidentes para los expertos en la técnica sin separarse del ámbito y espíritu de la invención según ha sido descrita antes, definida en las reivindicaciones adjuntas, y como se muestra en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo I

Preparación de N-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lis-Phe-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>

30

09067

1 (a) Boc-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-D-Lis(Boc)-Pro-  
-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-NH<sub>2</sub>

Se disuelven en 25 ml de DMF 2,53 g de Boc-Met-Ala-  
-Ala-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-OH (2,6 mmoles) (véase 302 an-  
5 tes) y 422 mg de HOBt (1,2 eq.). La solución se enfría a 0°C,  
tras lo cual se añaden una solución de 2,48 g de H-D-Lis(Boc)-  
-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-NH<sub>2</sub>.HCl (2,5 mmoles) en 20  
ml de DMF (205) y 1,1 eq. de TEA. La temperatura de la mez-  
cla de reacción se ajusta a aproximadamente 35°C, tras lo  
10 cual se añaden 857 mg de DCCI (1,6 eq.) a esa temperatura, y  
la totalidad se agita durante la noche. Subsiguientemente se  
enfria la mezcla a -20°C, se separa por filtración la DCHU  
formada, y el filtrado se evapora a sequedad. El residuo se  
disuelve en 200 ml de sec-butanol/CHCl<sub>3</sub> (2:3) y 50 ml de H<sub>2</sub>O,  
15 tras lo cual la solución se lava con agua, solución de NaHCO<sub>3</sub>  
al 5%, agua de nuevo, y finalmente se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se  
separa por filtración el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y el filtrado se evapora a  
sequedad. Rendimiento: 4,2 g.

Rf en Bu:Ac:agua (10:1:3) = 0,75 sobre SiO<sub>2</sub>.

20 (b) H-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lis-Phe-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub>.acetato

3,97 del anterior rendimiento de 4,2 g de Boc-Met-  
-Ala-Ala-Phe-D-Lis(Boc)-Phe-Gli-D-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-  
-Lis(Boc)-NH<sub>2</sub> se disuelven en 80 ml de ATF al 90%, y la so-  
25 lución se agita bajo nitrógeno y en la oscuridad durante 1,5  
horas a temperatura ambiente.

Luego se añade gota a gota la mezcla de reacción a  
500 ml de éter seco. La sustancia sólida se separa por filtra-  
ción, se lava con éter y se seca, tras lo cual el residuo  
se disuelve en t-butanol/H<sub>2</sub>O (1:1) y se agita con una resina

intercambiadora de iones en forma acetato. Tras agitar durante 1 hora, la resina intercambiadora de iones se separa por filtración y el filtrado se evapora a sequedad. El producto crudo se somete a purificación en contracorriente (sistema sec-butanol/0,1% ATF). Las fracciones recogidas se evaporan a sequedad, y el residuo se disuelve en t-butanol/H<sub>2</sub>O (1:1), tras lo cual se vuelve a tratar con la resina intercambiadora de iones en forma acetato, y se filtra. El filtrado se evapora a sequedad. Rendimiento 2,27 g (65,8%);

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (38:24:8:30) = 0,40 sobre Woelm

#### Ejemplo II

Preparación de H-Met(→O<sub>2</sub>)-Ala-Ala-Phe-D-Lis-Phe-Gli-D-Lis-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>.acetato

2,0 g de H-Met-Ala-Ala-Phe-D-Lis-Phe-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>.acetato (del ejemplo I) se disuelven en 10 ml de H<sub>2</sub>O, tras lo cual se añaden 0,25 ml de molibdato amónico 0,5M, 1,25 ml de HClO<sub>4</sub> 4M y 0,75 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Luego se agita la totalidad durante 4 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden a la mezcla de reacción 50 ml de terc-butanol/H<sub>2</sub>O (1:1) y 1 g de una resina intercambiadora de iones adecuada (Dowex 2 x 8) en forma acetato. Tras agitar durante 30 minutos, la resina intercambiadora de iones se separa por filtración, y el filtrado se evapora a sequedad.

Rendimiento: 1,9 g;

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (38:24:8:30) = 0,32 sobre Woelm

#### Ejemplo III

Preparación de H-Met(→O)-Ala-Ala-Phe-D-Lis-Phe-Gli-D-Lis-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>.acetato

0,06 moles del péptido obtenido en el Ejemplo I se

1 disuelven en 5 ml de ácido acético, tras lo cual se añaden  
 15 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. La solución se agita  
 durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo cual se aña-  
 5 de una suspensión de 20 mg de negro de platino en 2,5 ml de  
 ácido acético glacial. Luego se agita la mezcla durante 30  
 minutos, tras lo cual se filtra. El filtrado se evapora a  
 sequedad bajo vacío, y el residuo se añade a 10 ml de tere-  
 -butanol/agua. Luego se liofiliza la mezcla.

Rf en Bu:Pi:Ac:agua (38:24:8:30) = 0,29 sobre Woelm.

10 Ejemplo IV

Preparación de H-Met(→O<sub>2</sub>)-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-  
-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>.acetato

15 4,0 g del péptido preparado antes en 311 se copu-  
 lan al péptido 205, usando el método de DCCI/HOBT según se  
 describe en el Ejemplo I(a). El producto final protegido  
 tiene un Rf en Bu:Ac:agua (10:1:3) de 0,73 sobre SiO<sub>2</sub>.

La desprotección y posterior elaboración se efec-  
 túan de la manera descrita en el Ejemplo I(b). Rendimiento:  
 1,55 g;

20 Rf en Bu:Pi:Ac:agua (38:24:8:30) = 0,19 sobre Woelm

Ejemplo V

Los acetatos de los siguientes péptidos se obtienen  
 bajo las mismas condiciones y de manera correspondiente a  
 la descrita en el Ejemplo I:

25 1. H-Met-Ala-Ala-Ala-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (301 y 205)

Rf = 0,20

2. H-Ala-Ala-Ala-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 303 y 205);

Rf = 0,35

- 1 3. H-Val-Ala-Ala-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 304 y 205)  
Rf = 0,42
- 5 4. H-Met(→O<sub>2</sub>)-Gli-Ala-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-  
-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 305 y 205);  
Rf = 0,19
- 5 5. H-Met-Glu-Ala-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> ( de los anteriores 306 y 205);  
Rf = 0,34
- 10 6. Desamino-Met-Ala-Ala-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-  
-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 307 y 205);  
Rf = 0,47
- 15 7. H-Ala-Ala-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-  
-NH<sub>2</sub>( de los anteriores 308 y 205);  
Rf = 0,40
8. H-Ala-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>  
(de los anteriores 309 y 205);  
Rf = 0,42
- 20 9. H-Met-Gli-Ala-Ala-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 310 y 205);  
Rf = 0,18
10. H-Met-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 312 y 205);  
Rf = 0,29
- 25 11. H-Met-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 312 y 202);  
Rf = 0,36
12. H-Met-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-Gly ( de los anteriores 312 y 201);  
Rf = 0,52

- 1 13. H-Met-Ala-Ala-Ala-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Lis-Lis-  
OMe (de los anteriores 301 y 201);  
Rf = 0,30
- 5 14. H-Met-Glu-D-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-  
-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> ( de los anteriores 313 y 205);  
Rf = 0,31
- 10 15. H-Val-D-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-  
-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 314 y 205);  
Rf = 0,25
- 15 16. H-Gli-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 315 y 205);  
Rf = 0,20
- 15 17. H-D-Met-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-  
-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 316 y 205);  
Rf = 0,33
18. H-( $\alpha$ -Ile)Ala-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-  
-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 318 y 205);  
Rf = 0,28
- 20 19. H- $\beta$ -Ala-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-  
-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 317 y 205);  
Rf = 0,19
- 25 20. H-Met-Gln-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 320 y 205);  
Rf = 0,32
- 25 21. Desamino-Met-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-  
-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 321 y 205);  
Rf = 0,37
- 30 22. H-Met-Glu-His-Trp-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 322 y 205);  
Rf = 0,31

- 1      23. H-Met-Glu-His-Leu-D-Lis-Pen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 323 y 205);  
Rf = 0,27
- 5      24. H-Met-Glu-His-Val-D-Lis-Pen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 324 y 205);  
Rf = 0,28
25. H-Leu-Glu-His-Leu-D-Lis-Pen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 325 y 205);  
Rf = 0,25
- 10     26. H-Met-Ser-His-Pen-D-Lis-Pen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 326 y 205);  
Rf = 0,31
- 15     27. H-Met-Lis-His-Pen-D-Lis-Pen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 327 y 205);  
Rf = 0,15
28. N-acetil-Met-Ala-Ala-Pen-D-Lis-Pen-Gli-D-Lis-Pro-Val-  
-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 328 y 205);  
Rf = 0,50; y
- 20     29. H-Met-Glu-His-Tir-D-Lis-Pen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-  
-Lis-NH<sub>2</sub> (de los anteriores 329 y 205);  
Rf = 0,26

Todos los valores Rf en Bu:Pi:Ac:agua (38:24:8:30) sobre  
Woelm

#### Ejemplo VI

25      Los acetatos de los siguientes péptidos (en los  
que no se ha aplicado prolongación de cadena de N terminal)  
se preparan de la misma manera y bajo las mismas condiciones  
descritas en el Ejemplo I:

H-Pen-D-Lis-Pen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>

(de los anteriores 101 y 202); Rf = 0,11

1 H-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>

(de los anteriores 101 y 205); Rf = 0,13

H-Fen-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-OMe

(de los anteriores 101 y 201); Rf = 0,25

5 H-Fen-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-NH<sub>2</sub>

(de los anteriores 101 y 203); Rf = 0,01

H-Fen-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-Arg-Arg-Pro-Val-  
-Lis-Val-Tir-Pro-OH (de los anteriores 101 y 204); Rf = 0,05

H-Ala-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>

10 (de los anteriores 105 y 205), Rf = 0,12

Los valores Rf se midieron sobre SiO<sub>2</sub>, con Bu:Pi:  
Acagua (2:0,75:0,25:1) como eluyente.

#### Ejemplo VII

15 Los siguientes péptidos, cuya preparación se describe en el Ejemplo V, se oxidan a las correspondientes sulfonas bajo las mismas condiciones y de la manera descritas en el Ejemplo II. Estos péptidos se obtienen como acetatos.

H-Met(→O<sub>2</sub>)-Ala-Ala-Ala-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-  
-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>

20 Rf = 0,16

Desamino-Met(→O<sub>2</sub>)-Ala-Ala-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-  
-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> Rf = 0,12

H-Met(→O<sub>2</sub>)-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-Val-Gli-  
-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> Rf = 0,14

25 H-Met(→O<sub>2</sub>)-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-Lis-Pro-Val-Gli-  
-Lis-Lis-OMe Rf = 0,22

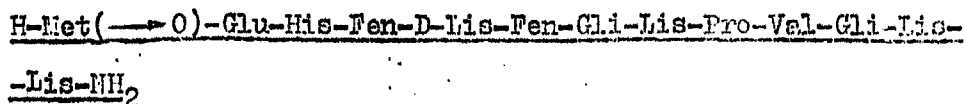
Desamino-Met(→O<sub>2</sub>)-Glu-His-Fen-D-Lis-Fen-Gli-D-Lis-Pro-  
-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub> Rf = 0,17

Los valores Rf se midieron sobre Woelm con Bu:Pi:Acagua  
(38:24:8:30) como eluyente.

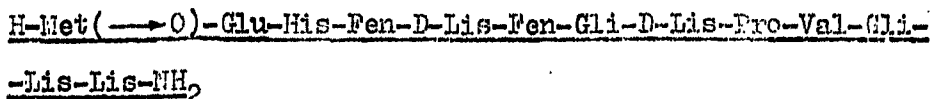
30

Ejemplo VIII

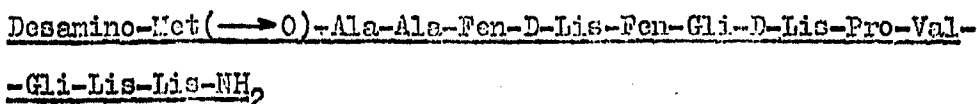
Los siguientes péptidos, cuya preparación se describe en el Ejemplo V, se oxidan a los correspondientes sulfoxidos bajo las mismas condiciones y de la manera descritas en el Ejemplo III. Los péptidos se obtienen como acetatos:



Rf = 0,19



Rf = 0,21



Rf = 0,10

Los valores Rf se midieron sobre Woelm con Bu:Pi:Ac:agua (38:24:8:30) como eluyente.

Ejemplo IX

3,3 g de Boc-Met-Ala-Ala-Fen-D-Lis(Boc)-Fen-Gli-OH (302) y 571,0 mg de HOOBt se disuelven en 20 ml de DMF, tras lo cual la solución se enfría a 0°C.

25 Se añade DCCI (760 mg) a esta solución. La mezcla se agita durante 1 hora a 0°C y aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente. El precipitado (DCHU) se separa por filtración, y se evapora el filtrado. El residuo obtenido (3,8 g), que es el correspondiente éster de benztriazina del anterior péptido de partida, y 4,06 g del péptido L-Lis(Boc)-Pro-Val-Gli-Lis(Boc)-Lis(Boc)-OH (206), se disuelven en 50

1 ml de DMF. La mezcla se agita durante aproximadamente 16 ho-  
 ras, y luego se evapora a sequedad. El residuo se disuelve  
 en 200 ml de sec-butanol/clorofoma (2:3) y se lava con  
 agua, HCl 0,01 y de nuevo agua. La solución se seca sobre  
 5  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y luego se filtra y se evapora a sequedad. Rendimien-  
 to 6,7 g.

El péptido obtenido se desprotege de la manera  
 descrita on el Ejemplo Ib. Rendimiento 4,0 g. Rf en Bu:Pi:  
 Ac:agua (38:24:8:30) = 0,35 sobre Woelm.

10 Ejemplo X

Complejo de cinc

De una solución de cloruro de cinc que contiene  
 50 mg de cinc por ml, se añaden 1,5 ml a una solución de  
 31,5 mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 30 ml de agua destilada. El pre-  
 15 cipitado de fosfato de cinc formado se disuelve de nuevo  
 añadiendo HCl 4N. Luego se añaden a esta mezcla 175 mg de  
 NaCl y 0,5 de alcohol bencílico. Después se disuelven en es-  
 ta mezcla 1,5 mg del péptido H-Met-Ala-Ala-Pen-D-Lis-Pen-Gli-  
 -D-Lis-Pro-Val-Gli-Lis-Lis-NH<sub>2</sub>, y luego el hidróxido sódico  
 20 1N suficiente para ajustar el pH de la mezcla a 8,5. Tras  
 ello se completa el volumen a 50 ml con agua destilada.

1 ml de la suspensión contiene:

30  $\mu\text{g}$  del péptido  
 1,5 mg de cinc  
 25 0,63 mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
 3,5 mg de NaCl  
 10 mg de alcohol bencílico.

El 1 ml de suspensión se liofiliza y almacena en  
 30 una ampolla. Por adición de 1 ml de agua esterilizada a la

1 ampolla, la suspensión está lista para fines de inyección.

Ejemplo XI

Tableta

5 Se prepara un granulado consistente en 2,5 mg de carboximetilcelulosa, 20,0 mg de almidón y 68,5 mg de lactosa. Este granulado se mezcla cuidadosamente con una mezcla consistente en 7,5 mg del péptido del Ejemplo I, 1 mg de talco y 0,5 mg de estearato de magnesio, tras lo cual la mezcla se comprime a una tableta de 100 mg.

10

Ejemplo XII

Preparación para inyección

Péptido del Ejemplo I	5,0 µg
NaCl	9,0 mg
Oxibenzoato de metilo	1,2 mg
15 Agua destilada exenta de pirógenos	1,0 ml

Ejemplo XIII

Cápsula

Cápsula de gelatina de envoltente dura, que contiene

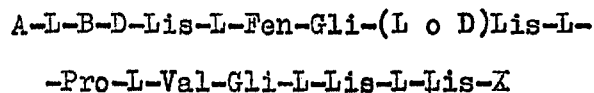
Péptido del Ejemplo I	0,5 mg
20 Estearato de magnesio	1,45 mg
Povidone	5,5 mg
Mannita	137,0 mg

25

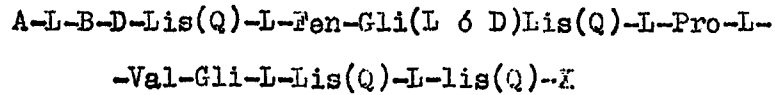
REIVINDICACIONES

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

10 1ª.- Procedimiento para la preparación de derivados de péptidos de fórmula:



15 o un derivado funcional de los mismos, donde A es una prolongación de cadena de N terminal elegida del grupo que consta de (1) hidrógeno y (2) los radicales N-acilo derivados de (a) ácidos alcoholcarboxílicos que tienen de uno a aproximadamente seis átomos de carbono, (b) ácidos aralcoholcarboxílicos que tienen de siete a aproximadamente  
20 diez carbonos, (c) aminoácidos, (d) péptidos, (e) los derivados de N-alcoholcarbonilo o N-aralcoholcarbonilo de dichos aminoácidos, y (f) los derivados de N-alcoholcarbonilo o N-aralcoholcarbonilo de dichos péptidos; B es un resto de aminoácido elegido del grupo que consta de Fen, Trp, Tir y  $-\text{NH}-\text{CHR}_1-\text{CO}-$ , donde  $R_1$  es hidrógeno o alcoholo  
25 de uno a aproximadamente seis átomos de carbono; y X es un miembro elegido del grupo que consta de hidroxilo, radicales hidroxilo esterificado, radical amino no sustituido y radicales amino sustituidos, caracterizado porque un  
30 compuesto de fórmula:



5 en la que (Q) representa un grupo protector de amino y A, B y X tienen los significados definidos anteriormente, con la condición de que los restos de aminoácido Lis y Glu en la definición de A y X estén provistos de un grupo protector y los restos de aminoácido de N y/o C terminales estén provistos opcionalmente de un grupo protector, 10 es desprotegido por medio de una reducción o hidrólisis a una temperatura comprendida entre  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $50^{\circ}\text{C}$ .

2<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, caracterizado porque se prepara un péptido en el que B representa Fen o Ala.

15 3<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup> o reivindicación 2<sup>a</sup>, caracterizado porque se prepara un péptido en el que A es un radical N-acilo elegido del grupo que consta de U-Q<sub>1</sub>, U-Q<sub>2</sub>-Q<sub>1</sub> y Q<sub>3</sub>-Q<sub>2</sub>-Q<sub>1</sub>, donde U se elige del grupo que consta de hidrógeno, N-alcoholcarbonilo de uno a aproximadamente seis carbonos, y N-aralcoholcarbonilo de siete a aproximadamente diez átomos de carbono; Q<sub>1</sub> se elige del grupo de restos aminoácido consistente en L-His, D-His ó NH-Z-CO, donde Z es un resto alcoholeno o alcoholideno no sustituido, monosustituido con hidroxilo 20 o monosustituido con amino, de uno a aproximadamente seis átomos de carbono; Q<sub>2</sub> se elige del grupo de restos de aminoácido consistente en L-Glu, D-Glu, L-Gln, D-Gln ó -NH-Z-CO-; y Q<sub>3</sub> se elige del grupo de restos de ácido consistente en U-L-Met, U-L-Met( $\rightarrow$  O), U-L-Met( $\rightarrow$  O<sub>2</sub>), U-D-Met, 25 U-D-Met( $\rightarrow$  O), U-D-Met( $\rightarrow$  O<sub>2</sub>), desamino-Met, desamino-Met

( $\rightarrow$  O), desamino-Met( $\rightarrow$  O<sub>2</sub>) y UNH-Z-CO-.

4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª o 2ª, caracterizado porque se prepara un péptido de fórmula Q<sub>3</sub>-Q<sub>2</sub>-Q<sub>1</sub>-L-B-D-Lis-L-Fen-Gli-D-Dis-L-Pro-L-Val-Gli-L-Lis-L-Lis-NH<sub>2</sub> o un derivado funcional del mismo, donde Q<sub>3</sub>, Q<sub>2</sub> y Q<sub>1</sub> tienen los significados asignados en la reivindicación 3ª y B y X tienen los significados asignados en la reivindicación 1ª.

5ª.- Procedimiento según la reivindicación 4ª, caracterizado porque se prepara un péptido en el que Q<sub>3</sub>-Q<sub>2</sub>-Q<sub>1</sub> representa un resto de péptido elegido del grupo que consta de H-Met-Ala-Ala, H-Met( $\rightarrow$  O)-Ala-Ala, H-Met( $\rightarrow$  O<sub>2</sub>)-Ala-Ala, H-Met( $\rightarrow$  O<sub>2</sub>)-Glu-His, desamino-Met( $\rightarrow$  O)-Ala-Ala, desamino-Met( $\rightarrow$  O)-Ala-Ala y desamino-Met( $\rightarrow$  O<sub>2</sub>)-Glu-His.

6ª.- Procedimiento para la preparación de derivados de péptidos.

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

Esta Memoria consta de cuarenta y cinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 31.ENE.1979

P.A.

Fernando de Elzaburu  
Per Poder.

