

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

10	ES	11	NUMERO	469016	10	AI
		21				
		22	FECHA DE PRESENTACION	21 ABR. 1978		

(RAN 4105/35)

**PATENTE DE INVENCION**

Concedido el Registro de acuerdo  
los datos que figuran en la pre-  
sente descripción y según el con-  
tenido de la Memoria adjunta.

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31	NUMERO			
		789.898	22 Abril 1977		U.S.A.
		871.563	23 Enero 1978		U.S.A.

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			CO7C		

60 TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE ALFA<sub>1</sub> TIMOSINA"

71 SOLICITANTE (ES)

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

BASILEA (Suiza)

73 INVENTOR (ES)

Su-Sun Wang.

73 TITULAR (ES)

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.

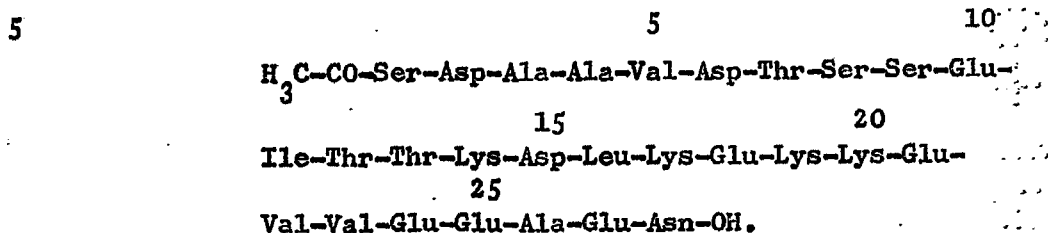
74 REPRESENTANTE

D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.

POOR  
QUALITY

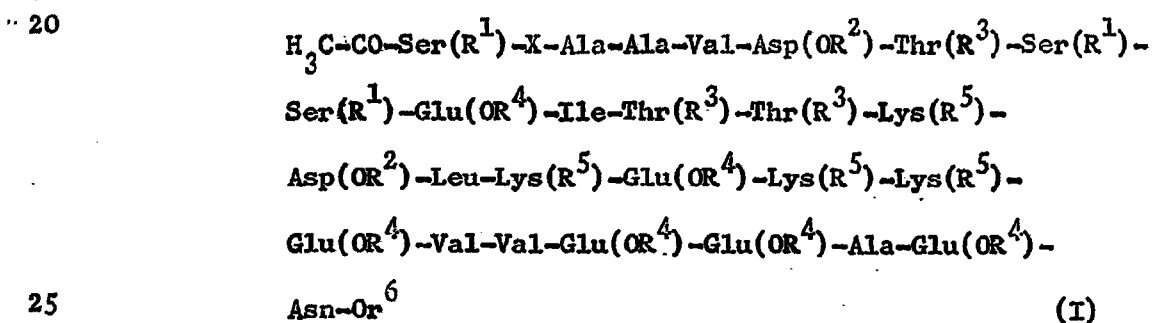
MEMORIA DESCRIPTIVA

La alfa<sub>1</sub> timosina es un compuesto polipeptídico altamente ácido estable al calor de 28 radicales aminoácidos de la secuencia siguiente:



10 Este péptido, que es un potente agente inmunopotenciador, se aisló de la fracción timosínica 5 por Goldstein y col., mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y filtración de gel (Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 74, 725-729 (1977)).

15 El presente invento se refiere a una síntesis de alfa<sub>1</sub> timosina o su [Asn<sup>2</sup>]-análogo y sus sales aceptables en farmacia mediante la separación de los grupos protectores de un octacosapéptido de la secuencia:



en donde

- X es Asn o Asp(OR<sup>2</sup>);  
R<sup>1</sup> es un grupo protector convencional para el grupo hidrofílico del radical de serina;  
30 R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>6</sup> son grupos protectores del grupo carboxílico convencional;

$R^3$  es un grupo protector convencional para el grupo hidroxílico de treonina y  $R^5$  es un grupo protector convencional para el grupo omega-amino del radical de lisina,

5

y, si se desea, la conversión del compuesto obtenido en una sal aceptable en farmacia.

Ejemplos de  $R^1$  son bencilo, acetilo, benzoilo, tercibutilo, tritilo, 4-bromobencilo, 2,6-diclorobencilo y benciloxicarbonilo, prefiriéndose el bencilo. Ejemplos de  $R^2$ ,  $R^4$  y  $R^6$  son grupos arílicos particularmente fenilo o fenilo sustituido por alquilo inferior, halo, nitro, mecapto o mercapto sustituido tal como metiltio; grupos aralquílicos tal como bencilo o bencilo sustituido por metoxilo, halo o nitro; grupos de alquilo inferior tal como metilo, etilo, tercibutilo y terciamilo; grupos de alquilo inferior sustituidos tal como 2-haloetilo, beta,beta-dimetilaminoetilo y cianometilo; grupos de benzhidrilo y fenacilo, prefiriéndose el bencilo. Ejemplos de  $R^3$  son bencilo, acetilo, benzoilo, tercibutilo, tritilo, 2,6-diclorobencilo, 4-bromobencilo y benciloxicarbonilo, prefiriéndose el bencilo. Ejemplos de  $R^5$  son benciloxicarbonilo que puede estar opcionalmente sustituido en el anillo aromático tal como por 4-cloro, 2-bromo, 4-bromo, 2,4-dicloro, 4-nitro, 4-metoxi, 3,5-dimetoxi, 4-metilo, 2,4,6-trimetilo, 4-fenilazo, 4-(4-metoxifenilazo), 2-(N,N-dimetilcarbamido) y 2-nitro-4,5-dimetoxi, grupos protectores de tipo uretánico tal como 4-toluensulfoniletiloxicarbonilo, 9-fluorenilmetiloxicarbonilo y grupos dissociables de base afines, 5-bencisoxazolilmetilenoxicarbonilo, metiltio- y metilsulfoniletiloxicarbonilo, isonicotiniloxicarbonilo, haloetiloxicarbonilo,

10

15

20

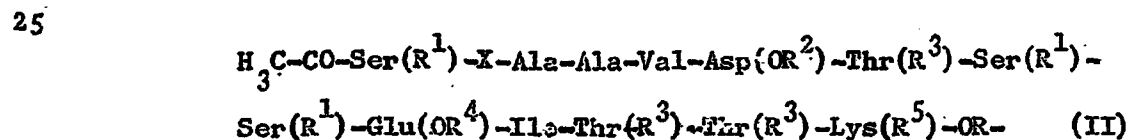
25

30

diisopropilmetiloxycarbonilo, benzhidriloxycarbonilo, isobor-  
niloxycarbonilo, dinitrodifenilmetiloxycarbonilo, tercibuti-  
loxycarbonilo, terciamiloxycarbonilo, adamantiloxycarbonilo,  
ciclopentiloxycarbonilo, metilciclobutiloxycarbonilo, metil  
5 ciclohexiloxycarbonilo, grupos de 2-arilisopropiloxycarboni-  
lo tal como 2-(p-bisfenilil)-isopropiloxycarbonilo, 2-(4-pi-  
ridil)-isopropiloxycarbonilo y grupos uretánicos conteniendo  
nitrógeno afines; grupos acílicos tal como formilo, trifluo-  
roacetilo, ftaloilo, bencensulfonilo, acetoacetilo, clóroa-  
10 cetilo, 2-nitrobenzoilo, 4-toluensulfonilo, grupos sulfení-  
licos tal como bencensulfenilo, o-nitrofenilsulfenilo y gru-  
pos sulfenílicos afines, y grupos de aril-alquilo inferior  
tal como difenilmetilo y trifenilmetilo, prefiriéndose el  
grupo de benciloxycarbonilo.

15 La separación de los grupos protectores  
del octacosapéptido protegido de la secuencia I se lleva a  
cabo fácilmente siguiendo procedimientos de por sí conocidos,  
tal como, por ejemplo, mediante tratamiento con ácido anhi-  
dro tal como fluoruro de hidrógeno, de preferencia en presen-  
20 cia de anisol.

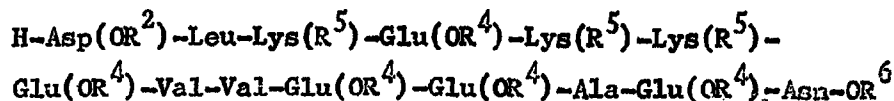
De conformidad con el presente invento  
el octacosapéptido protegido de secuencia I puede sintetizar-  
se por condensación de un tetradecapéptido protegido de la  
secuencia



con un tetradecapéptido protegido de secuencia

30





en donde

X, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>6</sup> tienen el significado an-  
tes indicado y

R<sup>7</sup> es hidrógeno o un grupo activante.

La reacción de copulación antes citada puede llevarse a cabo utilizando procedimientos bien conocidos en la síntesis de péptidos de fase en solución.

5  
10  
15  
Así pues, por ejemplo, el tetradecapéptido amino-terminal puede hacerse reaccionar con 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y dicitclohexilcarbodiimida (DCC) para obtener el éster activado que se hace reaccionar luego con el tetradecapéptido carboxilo-terminal para obtener el octacosapéptido deseado en forma protegida.

Los tetradecapéptidos protegidos pueden prepararse de conformidad con métodos bien conocidos en el arte.

20  
La estrategia utilizada en la síntesis química del tetradecapéptido carboxilo-terminal protegido III [X = Asp(OBzl)] fue como sigue:

Primero se acopló H-Glu(OBzl)-OH a Boc-Ala-OSu para obtener el fragmento dipeptídico protegido Boc-Ala-Glu(OBzl)-OH que se condensó luego con HCl. H-Asn-OBzl a través del procedimiento DCC/HOSu de Wunsch y Drees, Chem. Ber. 99, 110 (1966).

25  
La sal clorhidrato de éster bencílico de asparagina se preparó a partir de Boc-Asn-OBzl que a su vez se sintetizó a partir de Boc-Asn-OH del comercio y bromuro de bencilo utilizando la sal de cesio del aminoácido.

30  
El grupo Boc-protector se separó mediante un tratamiento de 30 minutos con HCl AN en THF seco.

La reacción entre H-Glu(OBzl)-OH y Boc-Glu(OBzl)-OSu produjo Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OH en forma de

un aceite limpiado incoloro. A continuación se utilizó en la síntesis del pentapéptido protegido Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl en una condensación de fragmento intermedio DCC/HOSu utilizando HCl • H-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl que se derivó de Boc-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl mediante tratamiento con HCl 4N/THF.

El pentapéptido protegido antes citado se obtuvo con buen rendimiento en forma de un material puro cristalino.

Para la preparación del octapéptido protegido Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl, se preparó primero el tripéptido protegido Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-OH. Se dejó reaccionar Boc-Val-OSu con valina libre para proporcionar Boc-Val-Val-OH que mediante desbloqueo con HCl 4N en THF seguido de reacción con Boc-Glu(OBzl)-OSu dió el tripéptido deseado que se cristalizó como la sal ciclohexilamínica Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-OH • CHA. La sal ciclohexilamínica se convirtió en el ácido libre y luego se acopló mediante DCC en presencia de HOSu a HCl • H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl que se derivó de Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl mediante tratamiento con HCl en THF. El octapéptido protegido Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl se obtuvo en forma purificada como un sólido amorfo. Este se desprotegió mediante hidrogenólisis seguido de tratamiento con ácido trifluoroacético en la forma usual para obtener el octapéptido libre Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn.

Este producto se purificó mediante cromatografía de columna de intercambio iónico, lo que dió material homogéneo sobre cromatografía de capa delgada y electroforesis de papel.

Para la síntesis del undecapéptido protegido Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-

-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl, el fragmento tripeptídico requerido se sintetizó a partir de Boc-Lys(Z)-OSu y H-Lys(Z)-OH. El dipéptido Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH así obtenido se trató con HCl 4N en THF y la sal subsiguiente HCl, H-Lys-

5 (Z)-Lys(Z)-OH se dejó luego reaccionar con Boc-Glu(OBzl)-OSu para proporcionar el tripéptido deseado Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OH. Luego se activo el tripéptido con DCC y HOSu según el procedimiento de Weygand y col., Z. Naturforsch. 21b, 426 (1966), y la solución del éster tripeptídico activo Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OSu generada in situ se combinó con la sal trifluoroacetato de H-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu-

10 (OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl derivada del octapéptido bloqueado correspondiente mediante un tratamiento de 30 minutos con TFA. Con la adición de una pequeña cantidad de una base se obtuvo de este modo el undecapéptido protegido deseado Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-

15 -Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl. La desprotección del undecapéptido protegido Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-

20 -Asn-OBzl con ácido fluorhídrico anhidro proporcionó el undecapéptido libre Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn que resultó homogéneo sobre electroforesis de papel después de cromatografía de columna de intercambio iónico.

La síntesis del tetradecapéptido protegido siguió una pauta similar. El Boc-Leu-OSu se acopló al H-Lys(Z)-OH para proporcionar Boc-Leu-Lys(Z)-OH. Después de la separación del grupo N<sup>alfa</sup>-Boc con HCl 4N en THF y la reacción con Boc-Asp(OBzl)-OSu se obtuvo el tripéptido protegido Boc-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OH en forma de un sólido puro cristalino. Este se convirtió en el éster activo Boc-Asp(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OSu y se condensó con la sal trifluoroacetato de H-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-

25

30

-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl obtenida a partir de tratamiento de TFA del undecapéptido bloqueado correspondiente. El producto deseado Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys-(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl se obtuvo con buen rendimiento. La cromatografía de capa delgada indicó que el producto era homogéneo. El tetradecapéptido libre Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn se obtuvo a partir del compuesto protegido mediante tratamiento de ácido clorhídrico anhidro y purificación sobre una columna de intercambio iónico.

De modo similar el tetradecapéptido terminal amino protegido  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH$  se congreco a partir de un fragmento tetrapeptídico acetílico, un hexapeptido, y otro tetrapeptido utilizando procedimientos bien conocidos en la síntesis de los péptidos. Para la síntesis del tetrapéptido acetílico amino terminal,  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-OBzl$  se preparó a partir de  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-OH$  y bromuro de bencilo a través de la sal de cesio del aminoácido. La hidrozinólisis de  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-OBzl$  dió  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-HNNH_2$  en forma de un sólido cristalino puro con buen rendimiento. El desbloqueo de Boc-Ala-Ala-OH dió la sal clorhidrato dipeptídica  $HCl \cdot H-Ala-Ala-OH$ . El acoplamiento de este dipéptido con Boc-Asp(OBzl)-OSu proporcionó el tripéptido protegido Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH que se aisló como la sal dicitclohexilaminica. La separación del grupo amino protector y la condensación con  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-HNNH_2$  a través del procedimiento de azida de Honzl and Rudinger, Collection Czech. Chem. Commun. 26, 2333 (1961), dió el tetrapéptido parcialmente protegido



-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-HNNH<sub>2</sub>  
se aisló como sólido cristalino puro con un rendimiento ra-  
zonable.

5 Para la síntesis del tetrapéptido prote-  
gido Boc-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH, se utilizó un  
proceso por etapas similar utilizando el procedimiento de  
éster N-hidroxisuccinimídico activo de Anderson y Col. J.  
Amer. Chem. Soc. 86, 1839 (1964).

10 La reacción entre Boc-Thr(Bzl)-OSu y H-  
Lys(Z)-OH dió el dipéptido Boc-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH en for-  
ma de un aceite que se desprotegió en el extremo alfa-amino  
y se dejó reaccionar con Boc-Thr(Bzl)-OSu para proporcionar  
el tripéptido Boc-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH en forma de  
un sólido cristalino. La separación del grupo Boc y la  
15 reacción del material resultante HCl • H-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-  
Lys(Z)-OH con Boc-Ile-OSu dió el tetrapéptido protegido de-  
seado Boc-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH en forma de un com-  
puesto cristalino puro después de cromatografía sobre una  
columna de gel de sílice.

20 Este fragmento tetrapeptídico se desprotegió luego en el  
terminal amínico y se condensó con el hexapéptido protegi-  
do Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-  
-HNNH<sub>2</sub> siguiendo el método azídico para producir el decapép-  
tido protegido Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-  
25 -Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH con buen rendimien-  
to.

30 La separación del grupo Boc del compuesto  
decapéptídico con TFA y subsiguiente acoplamiento con el te-  
trapéptido terminal Ac-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-HNNH<sub>2</sub> a  
través del procedimiento azídico resultó en la formación del  
tetradecapéptido protegido requerido H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-Asp-

-(OBzl)-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu  
(OBzl)-Ile-Thr-(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH. Para el acoplamiento  
final este tetradecapéptido acetilico se activó con DCC  
y HOBT y el éster activo subsiguiente se dejó reaccionar luego  
5 con TFA. H-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-  
-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-  
-OBzl que se derivó del compuesto bloqueado correspondiente  
mediante tratamiento con TFA para obtener el octacosapéptido  
acetilico deseado H<sub>3</sub>C-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-Val-Asp-  
10 -(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr-(Bzl)-  
-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-  
-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-  
-OBzl. El tratamiento con HF anhidro separó todos los grupos  
protectores y la purificación en cromatografía de intercambio  
15 iónico dió alfa<sub>1</sub> timosina.

De modo análogo se obtuvo a partir del  
tetradecapéptido protegido H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-  
-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-  
-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH el tetradecapéptido libre H<sub>3</sub>C-  
20 -CO-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-  
-OH.

La síntesis de la alfa<sub>1</sub> (Asn<sup>2</sup>)-timosina siguió la misma pauta que la síntesis de la alfa<sub>1</sub> timosina.

Todos los intermediarios utilizados fueron  
25 los mismos a excepción de la hidrazida acetyl-tetrapeptídica  
N-terminal H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-HNNH<sub>2</sub>. Para la  
síntesis de este compuesto se convirtió primero Boc-Ala-Ala-  
OH- en Boc-Ala-Ala-OBzl que con la separación selectiva del  
grupo Boc con HCl, dió la sal de éster dipéptido HCl • H-  
30 -Ala-Ala-OBzl. Luego se acoplo el dipéptido con Boc-Asn-  
OH utilizando el procedimiento DCC/HOBT de König and Geiger,

Chem. Ber. 103, 788(1970), para obtener el éster tripeptídico protegido Boc-Asn-Ala-OBzl que se trató con HCl en THF - para separar el grupo Boc. El producto resultante HCl · H-Asn-Ala-Ala-OBzl se condensó luego (procedimiento DCC/HOBT) con H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-OH · DCHA para proporcionar el tetrapéptido protegido deseado H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-OBzl.

La hidrazida correspondiente H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-HNNH<sub>2</sub> se obtuvo con buen rendimiento con la hidrazinólisis de este compuesto. La condensación de fragmento entre la hidrazida y el decapeptido TFA · H-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH produjo el tetradecapeptido protegido H<sub>3</sub>C-Co-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH. Este compuesto se acopló luego al tetradecapeptido C-terminal desbloqueado Sal TFA antes discutida para proporcionar la Alfa<sub>1</sub> [Asn<sup>2</sup>]-timosina protegida correspondiente. La separación de todos los grupos protectores mediante tratamiento con HF anhidro, seguido de purificación cromatográfica de columna de intercambio iónico dió la alfa<sub>1</sub> [Asn<sup>2</sup>]-timosina deseada, mientras que el mismo procedimiento con el tetradecapeptido protegido H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH dió el tetradecapeptido acetilado H<sub>3</sub>C-CO-Ser-Asn-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-OH.

En un aspecto ulterior de este invento se ha descubierto que varios de los péptidos intermediarios utilizados en la síntesis anterior de alfa<sub>1</sub> timosina y alfa<sub>1</sub> [Asn<sup>2</sup>]-timosina tienen actividad en la regulación, diferenciación y función de células T, o sea

Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn;

Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn;

Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Ala-Glu-  
-Asn;

5                   H<sub>3</sub>C-CO-Ser-Asn-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Glu-Ile-  
Thr-Thr-Lys; y

                  H<sub>3</sub>C-CO-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile  
-Thr-Thr-Lys.

10                   La alfa<sub>1</sub> timosina, alfa<sub>1</sub> [Asn<sup>2</sup>]-timosina,  
los nuevos octa-, undeca- o tetradecapéptidos que forman parte  
del presente invento y sus sales aceptables en farmacia -  
pueden administrarse a mamíferos de sangre caliente mediante  
aplicación parenteral ya sea por vía intravenosa, subcutánea  
15                   o intramuscular. Estos compuestos son potentes agentes inmu-  
nopotenciadores con una dosis diaria en la gama de alrededor  
de 1 a 100 mg/kg de peso corporal por día para administra-  
ción intravenosa. Obviamente la dosis requerida variará con  
la condición particular que se trate, la gravedad del estado y  
la duración del tratamiento. Una forma de dosificación apro-  
20                   piada para empleo farmacéutico es 1 mg de alfa<sub>1</sub> timosina, al-  
fa<sub>1</sub> [Asn<sup>2</sup>]-timosina, o uno de sus fragmentos peptídicos antes  
citados liofilizado para reconstituirse antes del empleo con  
la adición de agua o solución salina esteril.

25                   Se incluyen también dentro del alcance del -  
presente invento las sales aceptables en farmacia de alfa<sub>1</sub>  
timosina, alfa<sub>1</sub> [Asn<sup>2</sup>]-timosina, y sus fragmentos peptídicos  
antes citados. Las sales apropiadas incluyen las sales sódica  
o potásica con una base orgánica fuerte tal como guanidi-  
na. Además, pueden incluirse en la preparación los contraio-  
30                   nes de estos cationes tal como el cloruro, bromuro, sulfato,  
fosfato, maleato, acetato, citrato, benzoato, succinato, ma-  
lato, ascorbato y similares.

Las abreviaciones aquí utilizadas tienen el significado siguiente:

Boc = t-butiloxicarbonilo; Bzl = bencilo; DCC = diciclohexilcarbodiimida; DMF = dimetilformamida; THF = tetrahidrofurano; HOSu = N-hidroxisuccinimida; Triton B = solución metanólica al 40% de hidróxido de trimetilbencilamonio; NMA = N-metil-morfolina; CHA = ciclohexilamina; DCHA = diciclohexilamina; Z = benciloxicarbonilo; DMSO = sulfóxido de dimetilo; TFA = ácido trifluoroacético; TLC = cromatografía de capa delgada; Et<sub>3</sub>N = trietilamina; HOBT = 1-hidroxibenzotriazol.

Los ejemplos que siguen describen con detalle la síntesis de alfa<sub>1</sub> timosina y alfa<sub>1</sub>[Asn<sup>2</sup>]-timosina.

Si bien para la descripción de la síntesis de alfa<sub>1</sub> timosina y alfa<sub>1</sub>-[Asn<sup>2</sup>]-timosina se han utilizado grupos protectores específicos, queda dentro de la experiencia del arte el utilizar grupos protectores equivalentes en esta síntesis.

#### EJEMPLO 1

A. a) Se disolvió Boc-Asn-OH (11,0 g, 47,5 mmol) en 200 cc de MeOH y se adicionaron 20 cc de agua. Se tituló la solución hasta pH 7,0 con una solución acuosa al 20% de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (alrededor de 55 cc). Se evaporó la mezcla hasta sequedad y se reevaporó el residuo por dos veces en DMF (120 cc cada vez, 45°C). El sólido blanco obtenido se agitó luego con 8,9 g de bromuro de bencilo (52 mmol) en 120 cc de DMF durante 6 horas. Con la evaporación hasta sequedad y tratamiento con un gran volumen de agua el producto solidificó inmediatamente. Este se recogió por filtración se disolvió en acetato de etilo, se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporó hasta una masa sólida y se cristali

zó en acetato de etilo con éter de petróleo.

Rendimiento: 13,8 g (90,3%) de Boc-Asn-OBzl; punto de fusión 120-122°C;  $[\alpha]_D^{25} = -17,29^\circ$  (c = 1, DMF).

Se disolvió Boc-Asn-OBzl (13,7 g, 42,4 mmol) en 80 cc de THF y se trató con 500 cc de HCl 4N en THF. Se dejó en reposo la mezcla durante 45 minutos durante cuyo tiempo empezó a precipitar algo de producto. Mediante el tratamiento con 1000 cc de éter se formó inmediatamente un material sólido blanco. El producto se filtró, se lavó con éter y se secó sobre pellas de NaOH en vacío. Rendimiento: 10,3 g (94%) de HCl · H-Asn-OBzl; punto de fusión 122-126°C;  $[\alpha]_D^{25} = + 6,82^\circ$ .

b) Se molturó finamente en un mortero de mano H-Glu(OBzl)-OH (7,0 g, 29,5 mmol) y luego se agitó con 8,88 g (32,3 mmol) de Boc-Ala-OSu durante 48 horas en 250 cc de DMF en presencia de 6 cc de NMM. Se adicionó algo más de NMM para mantener la mezcla reaccional ligeramente básica durante la reacción. Se evaporó el disolvente y se repartió el residuo entre 300 cc de acetato de etilo y 500 cc de H<sub>2</sub>O conteniendo 2 cc de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%. Luego se lavó la fase orgánica tres veces con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta sequedad. Se recogió el producto en un pequeño volumen de éter y se trató con un gran volumen de éter de petróleo.

Se obtuvo un sólido amorfo y blanco que resultó homogéneo sobre TIC.

Rendimiento: 11,0 g (91,5%) de Boc-Ala-Glu(OBzl)-OH; punto de fusión 84-88°C;  $[\alpha]_D^{25} = 8,08^\circ$  (c = 1, DMF).

Se disolvió Boc-Ala-Glu(OBzl)-OH (10,4 g 25,4 mmol), HCl · H-Asn-OBzl (6,56 g, 25,4 mmol) y HOSu (5,9 g, 50,8 mmol) en DMF (250 cc, 0°C). Se adicionó DCC

(5,7 g, 27,6 mmol) seguido inmediatamente de  $\text{Et}_3\text{N}$  (3,5 cc). Se agitó la mezcla a  $0^\circ\text{C}$  durante 2 horas y luego a  $25^\circ\text{C}$  durante 40 horas en cuyo periodo se adicionó algo más de  $\text{Et}_3\text{N}$  de vez en cuando para mantener la reacción ligeramente básica. Se separaron por filtración los sub-productos insolubles y se evaporó el filtrado hasta sequedad. El material oleoso residual solidificó mediante el tratamiento con agua. El producto bruto se recogió en  $\text{CHCl}_3$ , se lavó con agua (3x), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó hasta volumen reducido. Se separó por filtración algo del sólido formado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó hasta volumen menor. Algo del sólido formado en esta fase se separó por filtración (altamente contaminado con dicitclohexilurea) y se trató el filtrado con éter de petróleo. Se obtuvo un producto cristalino.

Rendimiento: 8,0 g (51,4%) de Boc-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; punto de fusión  $102-105^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{25} = 12,5\%$  ( $c = 1, \text{DMF}$ ).

c) Se molturó en un mortero de mano H-Glu(OBzl)-OH (4,74 g, 20 mmol) y se agitó con Boc-Glu(OBzl)-OSu (0,7 g, 20 mmol) en DMF durante 36 horas en presencia de 3,6 cc de  $\text{NH}_4$ . La solución subsiguiente se evaporó hasta formar un jarabe y se trató con agua. El precipitado oleoso se recogió en acetato de etilo, se lavó sucesivamente con HOAc al 5% y agua (3 x), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó hasta sequedad, lo que dió 14,03 g de un aceite límpido. Este se dejó en reposo sumergido en éter de petróleo. El aceite residual Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OH pesó 10,2 g (90,0%).

La TLC indicó que el producto resultó homogéneo.

$[\alpha]_D^{25} = -7,59\%$  ( $c = 1, \text{DMF}$ ).

d) Se trató Boc-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (28,2 g; 46

mmol) con 1,1 litro de HCl 4N en THF durante 1 hora. La evaporación del disolvente y ácido en exceso dejó un aceite que se evaporó dos veces mas con THF fresco. El aceite residual se volvió un sólido cuando se trató con un gran volumen de éter. Se agitó el HCl·H-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl con Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OH (25,6 g, 46 mmol), HOSu (10,6 g, 92 mmol) y DCC (10,9 g, 53 mmol) en DMF (540 cc) a 0°C durante 1 hora y luego a 25°C durante 48 horas. Se adicionó Et<sub>3</sub>N para mantener la reacción ligeramente básica durante todo el periodo de tiempo (alrededor de 16 cc de Et<sub>3</sub>N en total). Los sub-productos insolubles formados se separaron por filtración y se evaporó el filtrado hasta sequedad.

El producto bruto se disolvió en CHCl<sub>3</sub>, se lavó con agua (3x), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta sequedad. El producto solidificó cuando se trató con éter de petróleo. La recristalización en isopropanol dió 28,9 g (59,8%) de Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; punto de fusión 169-175°C; [alfa]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -11,78° (c = 1, DMF).

Se trató Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (3,9 g, 3,48 mmol) con 15 cc de HCl 4N en THF durante 30 minutos. Empezó a formarse algo de producto cristalino. Se adicionó éter (210 cc) y el precipitado sólido se recogió y lavó con éter. Se cristalizó el material bruto en MeOH y éter. Rendimiento: 2,58 g (75,1%) de HCl·H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; punto de fusión 148-151°C; [alfa]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -3,65° (c = 1, DMF).

e) Se condensó Boc-Val-OSu (12,6 g, 40 mmol) y H-Val-OH (4,68 g, 40 mmol) en DMF (250 cc) durante 96 horas en presencia de 2 cc de Et<sub>3</sub>N. Se adicionó mas Et<sub>3</sub>N cuando fue necesario para mantener la reacción ligeramente básica. Se separó por filtración el material insoluble restan-

te y se evaporó el filtrado hasta sequedad (45°C). Se repartió el residuo entre éter y  $H_2SO_4$  diluido (alrededor del 1%) y se lavó la fase orgánica con agua (3 x), se secó sobre  $Na_2SO_4$  y se evaporó hasta obtener un cristal espumoso. El producto se cristalizó en éter y éter de petróleo. Rendimiento: 12,2 g (96,4%) de Boc-Val-Val-OH; punto de fusión 155-158°C;  $[\alpha]_D^{25} = + 1,10^\circ$  (c = 1, DMF).

Se trató Boc-Val-Val-OH (40,5 g 128 mmol) con 1,8 l de HCl 4N en THF durante 60 minutos. La evaporación para separar el ácido en exceso y el disolvente seguido de tratamiento con éter dió 34,5 g de HCl·H-Val-Val-OH en forma de un polvo blanco amorfo.

Se trató con Boc-Glu(OBzl)-OSu (55,6 g, 128 mmol) en 1 litro de DMF durante 24 horas y en presencia de 54 cc de  $Et_3N$ .

Se filtró la mezcla reaccional para separar algo del material insoluble y se evaporó el filtrado hasta sequedad. El residuo oleoso restante se recogió en EtOAc (1,5l) y se lavó con HOAc al 5% (2 x) seguido de agua (3 x). Se seco la fase orgánica ( $Na_2SO_4$ ) y se evaporó hasta sequedad, lo que dió un aceite claro incoloro que no cristaliza. Se disolvió así en 3,2 l de éter y se trató con CHA (17 cc) hasta que el pH de la mezcla fue de 7,5. La sal sólida obtenida se recogió y recristalizó en MeOH y éter. Rendimiento:

58,9 g (72,7%) de Boc-Glu(OBz)-Val-Val-OH·CHA; punto de fusión 158-160°C;  $[\alpha]_D^{25} = 33,41^\circ$  (c = 1, MeOH).

Se suspendió Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-OH·CHA (1,69 g, 2,66 mmol) en agua (40 cc) y acetato de etilo (40 cc) en un embudo separador cuando se adicionaron 4 cc de  $H_2SO_4$  1 M. Después de vigoroso sacudimiento se disolvió el sólido y se lavó la fase orgánica varias veces con agua, se secó sobre  $Na_2SO_4$  y se evaporó hasta obtener un

aceite (1,45 g). El tripéptido libre así obtenido se condensó luego con 2,58 g de HCl·H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (2,61 mmol) en 15 cc de DMF en presencia de HOSu (0,612 g, 5,32 mmol), NMM (0,3 cc, 2,66 mmol) y DCC (0,63, 3,06 mmol) durante 1 hora a 0°C y 60 horas a 25°C. Cuando fue preciso se adicionó mas NMM para mantener la reacción ligeramente básica.

Se formó un sub-producto insoluble que se separó por filtración y se evaporó el filtrado hasta sequedad (45°C). El residuo oleoso restante solidificó cuando se trató con agua. El sólido bruto se disolvió en DMF (50 cc) y precipitó con MeOH (300 cc). Rendimiento: 2,25 g (58,7%) de Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; punto de fusión 277-280°C;  $[\alpha]_D^{25} = -12,43^\circ$  (c = 1, DMF).

Este producto (0,72 g, 0,49 mmol) se hidrogenó sobre pd/BaSO<sub>4</sub> al 5% (0,5 g) durante 3 horas a 3,4 atm. en una mezcla de 40 cc de DMF/30 cc de MeOH/2 cc de H<sub>2</sub>O. Luego se filtró la mezcla y el filtrado se evaporó hasta sequedad. Se trató a continuación con 5 cc de TFA durante 30 minutos y el residuo obtenido, después de evaporación del ácido, se trituroó varias veces con éter. El sólido blanco subsiguiente se recogió en agua (20 cc) y se liofilizó lo que dió 0,47 g de producto bruto. El producto se cargó sobre una columna de 3 x 32 cm de una resina poliestirénica fuertemente básica (Bio-Rad AGL-X 2) equilibrada con tampón de acetato amónico de pH 8,1 (HOAc al 2% llevado a pH 8,1 con NH<sub>3</sub>). Se eluyó la columna sucesivamente con 200 cc cada vez de NH<sub>4</sub>OAc pH 5,5 0,025 M, HOAc 0,025 M, HOAc 0,05 M, HOAc 0,1 M, HOAc 0,25 M, HOAc 0,5 M, HOAc 0,75 M, HOAc 1M. Se recogieron fracciones de 12 cc y el eluato de cada tubo se controló mediante TLC. Las fracciones conteniendo el material

deseado (tubos 225-229) se depositaron y liofilizaron dos veces, lo que dió 0,223 g (48,1%) de Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn puro que resultó homogéneo sobre TLC y electroforesis de papel.

5 f). Se agitó Boc-Lys(Z)-OH (15 g, 39,5 mmol) con HOSu (5,8 g, 50,5 mmol) y DCC (8,66 g, 42 mmol) en THF (250 cc) durante 3 horas. Se separó por filtración un sub-producto insoluble y se evaporó el filtrado hasta sequedad. El jarabe residual (24,2 g) se trató con iso-propanol 10 (150 cc) y éter de petróleo (150 cc) lo que dió un producto oleoso (21 g) que no cristalizó. El éster activo bruto Boc-Lys(Z)-OSu se utilizó por tanto para condensación con H-Lys(Z)-OH (10,6 g, 38 mmol) en DMF (250 cc) durante 72 horas - en presencia de 5,5 cc de Et<sub>3</sub>N. Se adicionó ocasionalmen- 15 te mas Et<sub>3</sub>N para mantener la mezcla reaccional agitada ligeramente básica. Luego se separó por filtración cierta - pequeña cantidad de material sin disolver y se evaporó el filtrado hasta sequedad (45°C). El residuo oleoso restan- 20 te se trató con 1 litro de HOAc al 5%. El producto precipitado se extrajo en acetato de etilo y se lavó la fase orgánica con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta obtener un aceite. Este se cristalizó en acetato de etilo (300 cc) conteniendo DCHA (10 cc) como una sal. La recrista- lización en MeOH y éter dió 22,7 g (72,5%) de Boc-Lys(Z)- 25 -Lys(Z)-OH•DCHA; punto de fusión 160-162°C;  $[\alpha]_D^{25} = 2,212$  (c = 1, MeOH).

Se repartió Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH DCHA (10 g, 12,14 mmol) entre EtOAc (1 litro) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1N (1 litro). Luego se lavó la fase orgánica con agua (3x), se secó sobre 30 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta sequedad (7,9 g). El ácido libre Boc-Lys(Z)-Lys(Z)-OH, así obtenido se trató con HCl 4N recién preparado en THF durante 30 minutos. Se evaporó (30°C) el disolvente y el ácido en exceso y se re

-evaporó el residuo por dos veces con THF. El residuo restante solidificó cuando se trató con éter. La sal HCl·H-Lys(Z)-Lys(Z)-OH se recogió mediante filtración y se lavó varias veces con éter, lo que dió 6,7 g de polvo blanco.  
5 Se disolvió en DMF (70 cc), se enfrió en un baño de hielo y se trató con Et<sub>3</sub>N (1,63 cc) seguido de Boc-Glu(OBzl)-OSu (5,54 g, 12,76 mmol).  
Se agitó la mezcla a 0°C durante 1 hora y luego a 25°C durante 24 horas. Se adicionó mas Et<sub>3</sub>N durante este tiempo para mantener la reacción a aproximadamente pH 7,5.  
10 Se adicionaron unos pocos cc de ácido acético para volver acídica la reacción (pH 3,5) y se separó el disolvente mediante evaporación. El residuo subsiguiente se recogió en EtOAc, se lavó con agua (3x), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta sequedad cuando el producto empezó a solidificar. Este se trituró en éter y recristalizó en acetato de etilo. Rendimiento: 7,26 g (69,5%) de Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OH; punto de fusión 152-155°C; [alfa]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -2,71° (c = 1, THF).  
15 g) Se trató Boc-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (1,7 g, 1,16 mmol) con THF (24 cc) durante 30 minutos. Después de la evaporación del ácido en exceso (30°C) se trituró el residuo con éter. Se lavó a fondo el polvo obtenido con éter y éter de petróleo y se secó sobre NaOH en vacío, lo que dió la sal trifluoroacetato del octapéptido (1,71 g). Luego se generó in situ el éster activo Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OSu mediante la agitación de Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-OH (0,998 g, 1,16 mmol), HOSu (0,16 g, 1,4 mmol) y DCC (0,274 g, 1,33 mmol) en 15 cc de DMF a 0°C durante 3 horas. A esta solución conteniendo el éster tripeptídico activo se adicionó  
20  
25  
30

la sal octapéptica  $\text{CF}_3\text{COOH}\cdot\text{H-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl}$  (1,71 g) junto con 0,2 cc de  $\text{Et}_3\text{N}$ .

5 Se adicionaron unas pocas gotas mas de  $\text{Et}_3\text{N}$  y DMF (15 cc) y se agitó la mezcla durante 3 días a 25°C. se formó un semi-sólido gelatinoso. Este se acidificó con ácido acético y se trató con agua. El precipitado sólido blanco se recogió y lavó ( $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, éter), lo que dió 2,25 g de producto bruto fundente a 310-313°C. Se disolvió en DMF y precipitó con MeOH. Rendimiento: 1,75 g (68,3%) de Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; punto de fusión 314-316°C;  $[\alpha]_D^{25} = 13,68^\circ$  (c = 1, DMSO); homogéneo sobre TLC.

15 Se disolvió Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (0,5 g, 0,226 mmol) en 2 cc de TFA y se agitó con 15 cc de HF a 0°C durante 15 minutos. Después de la evaporación del ácido en exceso (0°C), se disolvió el residuo en HOAc acuoso al 5%, se lavó con éter (3x), se evaporó hasta volumen menor y se liofilizó, lo que dió 0,34 g de producto bruto. Este se cromatografió sobre la columna de intercambio iónica tal como se ha descrito anteriormente para el octapéptido, lo que dió 0,13 g (42,1%) de Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn;  $[\alpha]_D^{25} = -85,65^\circ$  (c = 1,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

25 h) Se condensó Boc-Leu-OSu (4,0 g, 12,2 mmol) y H-Lys(Z)-OH (3,42 g, 12,2 mmol) en DMF (75 cc) durante 48 horas en presencia de  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,7 cc). El pH de la reacción se mantuvo a 7,5 con la adición de  $\text{Et}_3\text{N}$  periódicamente como es usual. Se separó por filtración el material insoluble restante y se evaporó el filtrado hasta sequedad. 30 El vidrio espumoso subsiguiente se disolvió en éter

(200 cc) y se trató la mezcla con 3 cc de DCHA para producir material cristalino que se recogió, lavó con éter y recristalizó en MeOH y éter. Rendimiento: 5,7 g (69,5%) de Boc-Leu-Lys(Z)-OH.DCHA; punto de fusión 140-142°C;  $[\alpha]_D^{25} = -7,20^\circ$  (c = 1, MeOH).

5

Se convirtió Boc-Leu-Lys(Z)-OH.DCHA (2,97 g 4,4 mmol) en el ácido libre (repartido entre EtOAc y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 N) y se trató el aceite incoloro obtenido (2,2 g) con HCl 4N en THF (40 cc) durante 30 minutos. Se evaporó el ácido en exceso y el disolvente (30°C) y se trató el residuo con éter. El aceite restante se disolvió en éter y se evaporó por dos veces mas con éter fresco.

10

Luego se agitó el residuo con Boc-Asp(OBzl)-OSu (1,85 g, 4,4 mmol) en presencia de  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,85 cc) durante una noche.

15

Luego se evaporó la mezcla reaccional hasta sequedad lo que dió un residuo oleoso que se recogió en acetato de etilo, se lavó con agua (3x), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó de nuevo hasta sequedad. El producto bruto así obtenido se cristalizó en acetato de etilo y éter de petróleo y dió 1,52 g (49,6%) de Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-OH puro; punto de fusión 109-111°C;  $[\alpha]_D^{25} = -16,14^\circ$  (c = 1, DMF).

20

Se trató Boc-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (1,2 g, 0,545 mmol) con 35 cc de TFA durante 30 minutos. Se evaporó rápidamente el ácido en exceso y se trituró el residuo con éter varias veces para obtener 1,2 g de un decapeptito TFA-sal en forma de un polvo blanco. Este se disolvió en una mezcla de DMF (5 cc) y DMSO (2 cc) y se trató con Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-OSu generado in situ mediante la agitación de Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-OH (0,381 g, 0,545 mmol) con HOSu (0,126 g, 1,1 mmol) y DCC (0,124 g, 0,599 mmol) en 3 cc de

25

30

DMF a 0°C durante 3 horas. Se agitó a 0°C, durante 2 horas la mezcla conteniendo el éster de tripeptido activo y el undecapéptido y luego a 25°C durante 3 días en cuyo período se adicionó de vez en cuando  $\text{Et}_3\text{N}$  para mantener el pH ligeramente básico. Se formó una sustancia gelatinosa. Se trituró con HOAc al 5% y el sólido blanco resultante se filtró y lavó con agua, MeOH y éter, lo que dió 1,28 g de material bruto fundente a 325-326°C. La reprecipitación en DMF/DMSO (10 cc/5 cc) y MeOH (230 cc) dió 1,22 g (80,2%) de Boc-Asp-(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl; punto de fusión 326-327°C;  $[\alpha]_D^{25} = -15,71^\circ$  (c = 1, DMF/DMSO).

Este producto (1,128 g, 0,404 mmol) se mezcló con 7 cc de anisol y se trató con 25 cc de HF anhídrido a 0°C durante 15 minutos. Se evaporó el ácido en exceso (0°C y se repartió el residuo restante entre éter y agua. Se lavó la fase acuosa dos veces con éter, se evaporó hasta la mitad del volumen original y se liofilizó lo que dió 0,69 g de material bruto.

Este se cromatografió en la forma anteriormente descrita para el octapéptido. El material eluido en los tubos 101-120 se recogió y liofilizó, lo que dió 0,25 g de producto que demostró estar ligeramente contaminado con impurezas secundarias. Este se recromatografió por tanto en la misma columna para obtener 0,155 g (22%) de Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn puro. La electroforesis de papel indicó que era homogéneo.  $[\alpha]_D^{25} = -86,27^\circ$  (c = 1, HCl 0,1N).

B.a) Se disolvió H-Ser(Bzl)-OH (18,6 g, 95,4 mmol) en 45 cc de Triton B, se evaporó hasta sequedad y el residuo se reevaporó dos veces con DMF (100 cc cada vez).

Luego se agitó el residuo con AcOSu (16,9 g, 95,4 mmol) en 150 cc de DMF durante 20 horas. De vez en cuando se adicionó N-metil-morfolina para mantener la reacción ligeramente básica. Se separó el disolvente y a la extracción del producto en EtOAc le siguió el lavado con pequeños volúmenes de HOAc al 10% y H<sub>2</sub>O (el producto es acuoso soluble, utilizando un pequeño volumen de H<sub>2</sub>O). El secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporación hasta sequedad de nuevo dió un aceite claro (14,5 g, Ac-Ser-(Bzl)-OH). El compuesto no cristalizó. Se disolvió por tanto en una mezcla de 300 cc de MeOH y 30 cc de H<sub>2</sub>O; se tituló a pH 7,0 con Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% y se evaporó hasta obtener una masa sólida. La sal se reevaporó dos veces más con DMF y se agitó con bromuro de bencilo (15,4 g, 91 mmol) en 250 cc de DMF durante 18 horas. Con la evaporación del disolvente se recogió el residuo en H<sub>2</sub>O (600 cc) y el producto oleoso formado se extrajo en EtOAc. Este se lavó con H<sub>2</sub>O, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta obtener un jarabe que con siembra cristalizó inmediatamente. Se recrystalizó en EtOAc y éter de petróleo, lo que dió 10,42 g (32,2% en global) de H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-OBzl; punto de fusión 89-91°C.

Se disolvió H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-OBzl (2,2 g, 6,73 mmol) en 75 cc de EtOH y se agitó suavemente con 5 cc de H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub> durante una noche. Se separó por filtración algo de materia insoluble precipitada y se evaporó el filtrado hasta obtener un aceite que solidificó cuando se trató con éter. El producto se recrystalizó en un reducido volumen de EtOH y éter, lo que dió 1,40 g (82,8%) de H<sub>3</sub>CO-Ser(Bzl)-HNNH<sub>2</sub>; punto de fusión 128-130°C;  $[\alpha]_D^{25} = + 5,80^\circ$  (c = 1, MeOH).

b) Se disolvió L-alanina (3,57 g, 40 mmol) en 18,8 cc de Tritón B (40 mmol), se evaporó hasta sequedad, y el

residuo oleoso se reevaporó dos veces con DMF (30 cc cada vez). Se agitó la sal obtenida con 11,45 g de Boc-Ala-OSu (40 mmol) en 40 cc de DMF, con la adición de 1 cc de NMM, durante 20 horas. Se separó el disolvente y se recogió el residuo en HOAc al 10% (100 cc). Se extrajo el producto en EtOAc (4x100 cc), se lavó dos veces con un pequeño volumen de H<sub>2</sub>O, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporó hasta pequeño volumen, y se trató con éter de petróleo hasta se volvió turbio. Con el almacenamiento en el refrigerador durante una noche se formó un producto cristalino. Rendimiento: 8,2 g (76,3%) de Boc-Ala-Ala-OH; punto de fusión 115-118°C.

Se trató Boc-Ala-Ala-OH (36,2 g, 139 mmol) con 3 litros de HCl 4N en THF durante 30 minutos. La evaporación y elaboración final como es usual dió una masa oleosa que solidificó cuando se trató con éter. El producto se recristalizó en metanol con éter, lo que dió 9,1 g (33,3%) de HCl.H-Ala-Ala-OH; punto de fusión 209-211°C.

Se disolvió HCl.H-Ala-Ala-OH (2,36 g, 12 mmol) en 20 cc de DMF, se enfrió en un baño de hielo, y se trató con 1,68 cc de Et<sub>3</sub>N (12 mmol) seguido de Boc-Asp(OBzl)-OSu (12 mmol). Se agitó suavemente la mezcla a 0°C durante 2 horas y luego a 25°C durante una noche en cuyo tiempo se adicionó, en pequeñas proporciones, un equivalente más de Et<sub>3</sub>N (12 mmol), manteniendo el pH de la reacción próximo a 8,0. Se adicionaron unos pocos cc de HOAc y la mezcla acidificada se evaporó hasta sequedad. El producto formado se extrajo en EtOAc, se lavó con H<sub>2</sub>O (3 veces), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó hasta un residuo oleoso (6 g). Este se disolvió en EtOAc y se tituló a pH 8,0 con DCHA.

Precipitó la sal cristalina y se recristalizó en iso-propa-  
nol y éter de petróleo, lo que dió 5,1 g (65,7%) de Boc-Asp-  
(OBzl)-Ala-Ala-OH.DCHA; punto de fusión 138-141°;  $[\alpha]_D^{25} =$   
 $-13,33^\circ$  (c = 1, MeOH).

- 5 Se repartió Boc-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH.-  
DCHA (3,5 g, 5,4 mmol) entre 500 cc de EtOAc y 350 cc de H<sub>2</sub>O  
conteniendo 10 cc de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%. Se extrajo la fase acu-  
sa una vez mas con EtOAc (250 cc) y la fase de EtOAc combina  
da se lavó dos veces con H<sub>2</sub>O, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se eva-  
poró hasta sequedad, dejando un sólido vitreo de Boc-Asp-  
10 (OBzl)-Ala-Ala-OH (2,5 g). Este material se trató con 200  
cc de HCl 4N recién preparado en THF durante 30 minutos, se  
evaporó a 32°C hasta un jarabe, y se re-evaporó dos veces  
mas con THF. El residuo oleoso se solidificó cuando se tra-  
15 tó con éter. Este HCl.H-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH (1,93 g, 4,83  
mmol) se utilizó luego en la siguiente reacción que implica  
acoplamiento de azida con H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-N<sub>3</sub> que se preparó  
a partir de 1,24 g de H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-HNNH<sub>2</sub> (4,9 mmol) en  
25 cc de DMF (-25°C) con 7,42 cc de HCl 3,3 N en THF (24,5  
20 mmol) y se agitó 0,99 cc de i-amilnitrito (7,35 mmol) a -30°C  
durante 30 minutos. La solución azídica preparada se enfrió  
hasta -35°C, se mezcló con 4,1 cc de Et<sub>3</sub>N y luego se trató  
con el polvo blanco de HCl H-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH (1,93 g)  
preparado tal como se ha expuesto anteriormente.
- 25 Se agitó la mezcla a -20°C durante 30 minutos y luego a 4°C  
durante 2 días. Se adicionó algo mas de Et<sub>3</sub>N para mantener  
la reacción ligeramente básica. La elaboración final usual  
dió una masa cristalina que se recristalizó en THF y éter de  
petróleo, lo que proporcionó 1,85 g (65,6%) de H<sub>3</sub>C-CO-Ser-  
30 (Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-OH; punto de fusión 167-170°C;  $[\alpha]_D^{25}$   
 $= -18,91^\circ$  (c = 1, DMSO).

Se disolvió  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-$   
OH (0,825 g, 1,41 mmol) en 4 cc de DMF y se enfrió hasta 0°C  
en un baño de hielo. A la solución se adicionó  $H_2NNH_2$  (54,3  
mg; 1,69 mmol) seguido de HOBT. $H_2$  (0,475 g, 3,10 mmol) y  
5 DCC (0,32 g, 1,55 mmol). Se ajustó la mezcla a pH 7,5 con  
NMM y se agitó a 0°C durante 2 horas seguido de 17 horas a  
25°C. Durante este tiempo la mezcla reaccional se volvió un  
gel. Se diluyó con MeOH y se recogió el material sólido res-  
tante sobre un filtro de succión y se lavó a fondo con MeOH,  
10 éter y éter de petróleo, lo que dió un material fundente a  
229-232°C. Luego se precipitó el producto en DMF y MeOH, lo  
que dió 0,51 g (61,0%) de  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-$   
 $-HNNH_2$ ; punto de fusión 230-232°C;  $[\alpha]_D^{25} = -17,94^\circ$  (c = 1,  
DMSO).

15 c) Se agitó durante una noche y en presencia de  
 $Et_3N$  (2,3 cc, 165 mmol) H-Glu(OBzl)-OH (39,4 g, 166 mmol) con  
Boc-Ser(Bzl)-OSu (65,0 g, 166 mmol) en 900 cc de DMF. Se a-  
dicionó mas  $Et_3N$  durante este tiempo para mantener la mezcla  
reaccional ligeramente básica. Se evaporó la solución límpida  
20 hasta sequedad y se repartió el residuo oleoso entre  
EtOAc(1,5 litro) y HOAc al 5% (2 litros). Se lavó la fase  
orgánica con  $H_2O$  (2 veces), se secó sobre  $Na_2SO_4$ , y se concen-  
tró hasta un aceite límpido (90,0 g que se recogió en 3 li-  
tros de éter y se trató con 25 cc de ciclohexilamina.  
25 El sólido formado se recrystalizó en MeOH y éter. Rendimien-  
to: 76,2 g (74,8%) de Boc-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH.CHA; punto  
de fusión 154-156,5°C;  $[\alpha]_D^{25} = +6,32^\circ$  (c = 1, MeOH).

Se suspendió Boc-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH.CHA  
(76,2 g 124 mmol) en una mezcla de 1,5 litros de  $H_2O$  y 1,5  
30 litros de EtOAc. A esta mezcla se adicionó  $H_2SO_4$  al 10% has-  
ta que se volvió ácida (PH de 2,5 aproximadamente) y se di-

solvió el sólido. Se lavó la fase orgánica conteniendo el ácido libre dipeptídico con  $H_2O$  (2 veces), se secó, y se evaporó hasta sequedad, lo que dejó un aceite claro (68,5 g). Este se trató con 3 litros de HCl 4,1 N recién preparado en T

5 THF durante 45 minutos y se evaporó hasta obtener un residuo oleoso que se re-evaporó dos veces más con THF. El residuo ( $HCl.H-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH$ ) se disolvió en DMF (500 cc), se enfrió hasta  $0^{\circ}C$ , y se trató con Boc-Ser(Bzl)-OSu (48,66 g, 124 mmol), seguido inmediatamente de 27 cc de  $Et_3N$ . Se

10 agitó la mezcla durante una noche a  $25^{\circ}C$  en cuyo período de tiempo se adicionó ocasionalmente más  $Et_3N$  para mantener la mezcla reaccional ligeramente básica. Se separó por filtración algunas pequeñas cantidades de materias insolubles y se evaporó el filtrado hasta obtener un aceite que se recogió

15 en EtOAc, se lavó con HOAc al 5% y  $H_2O$ , se secó sobre  $Na_2SO_4$  y se evaporó de nuevo hasta sequedad. El producto se cristalizó en EtOAc con éter de petróleo. Rendimiento: 71,8 g - (83,7%) de Boc-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH; punto de fusión  $112-113^{\circ}C$ ;  $[\alpha]_D^{25} = +17,91^{\circ}$  (c = 1, THF).

20 Se trató Boc-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (71,6 g, 104 mmol) con 2,7 litros de HCl 3,9 N recién preparado en THF durante 45 minutos. Se evaporó la mezcla hasta sequedad y se evaporó el residuo por dos veces más con THF hasta obtener una masa sólida (59,3 g; punto de fusión  $161-165^{\circ}C$ ). Se

25 recogió y lavó con éter y se agitó en 500 cc de DMF con Boc-Thr(Bzl)-OSu (38,2 g, 94 mmol) en presencia de  $Et_3N$  (25 cc) a  $0^{\circ}C$  durante 1 hora y luego a  $25^{\circ}C$  durante 15 horas. Se adicionó más  $Et_3N$  (14,5 cc) en varias porciones durante este tiempo para mantener la mezcla reaccional ligeramente básica. Se

30 separó por filtración algo de la materia insoluble formada y se evaporó el filtrado hasta obtener un aceite que se disolvió en EtOAc (1,5 litro), se lavó con HOAc al 5%,  $H_2O$  (2x), se se-

có sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó hasta obtener una masa sólida. El producto recristalizado en EtOAc y éter de petróleo dió 64,8 g (78,1%) de Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH; punto de fusión 115-118°C;  $[\alpha]_D^{25} = +11,64^\circ$  (c = 1, DMSO).

5

Se trató Boc-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (54,5 g, 61,7 mmol) con HCl en THF (1,5 litros; 4,1N) y se procedió a la elaboración final como es usual para obtener HCl·H-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH

10

(46,3 g, 56,6 mmol) en forma de un polvo blanco. Luego se agitó en DMF (500 cc) con Boc-Asp(OBzl)-OSu (23,7 g, 56 mmol) a 0°C durante 2 horas en presencia de  $\text{Et}_3\text{N}$  (16 cc). Se agitó adicionalmente la mezcla a 25°C durante 15 horas en cuyo tiempo se adicionaron 7,4 cc mas de  $\text{Et}_3\text{N}$ . El producto se elaboró

15

como es usual y cristalizó en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y éter de petróleo. Rendimiento: 50,35 g (82,7%) de Boc-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH; punto de fusión 111-113°C;  $[\alpha]_D^{25} = +7,21^\circ$  (c = 1, DMSO).

20

Se desprotegió Boc-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (50,0 g, 46 mmol) con HCl (4,15 N) en THF y la elaboración final en la forma usual dió 45,4 g de sólido blanco. Se disolvió en THF (1,5 litros) y se trató con éter (7 litros). Con el reposo a 0°C durante una noche se obtuvo un polvo blanco (44,0 g, punto de fusión 179-184°C). Parte de este material, HCl·H-

25

-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (43,7 g, 42,7 mmol), se disolvió luego en 500 cc de DMF, se enfrió hasta 0°C, y se trató con Boc-Val-OSu (15,4 g, 49 mmol) y  $\text{Et}_3\text{N}$  (10 cc). Se agitó la mezcla durante 15 horas durante cuyo tiempo se adicionó mas  $\text{Et}_3\text{N}$  (7,9 cc) en varias porciones manteniendo la mezcla reaccional ligeramente básica. Se se

30

paró por filtración la materia insoluble y se evaporó el filtrado hasta sequedad. El residuo oleoso se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se lavó con HOAc al 5%,  $\text{H}_2\text{O}$ , se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó hasta un volumen menor (0,5 litro) cuando se trató con éter de petróleo. Con el reposo durante la noche el producto cristalizó lentamente. Este se recrystalizó en THF e iso-propanol, lo que dió 26,3 g (51,4% de Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH; punto de fusión 174-177°C;  $[\alpha]_D^{25} = +0,84^\circ$ . (c = 1, THF).

10 Se disolvió Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-OH (13,0 g; 10,94 mmol) en DMF (50 cc), se enfrió hasta 0°C, y se trató con  $\text{H}_2\text{NNH}_2$  (0,421 g; 13,14 mmol), HOBT (3,688 g; 24,1 mmol), y DCC (2,48 g; 12,04 mmol). Luego se adicionó NMM hasta que la mezcla reaccional mostró un pH de 7,5. Se agitó la mezcla durante 18 horas y se filtró para separar los sub-productos insolubles. Se evaporó el filtrado hasta sequedad y se trató el residuo con  $\text{H}_2\text{O}$ . El sólido formado se recogió y cristalizó en DMF e iso-propanol, lo que dió 8,7 g (66,4% de Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-HNNH<sub>2</sub>; punto de fusión 215-218°C;  $[\alpha]_D^{25} = +7,62^\circ$  (c = 1, DMSO).

20 d) Se trató Boc-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (14,0 g, 24,5 mmol) con 500 cc de HCl 4,0 N en THF durante 30 minutos, se evaporó hasta sequedad, y se re- evaporó dos veces con THF fresco. El residuo oleoso solidificó cuando se trató con éter. El polvo seco (11,4 g, 21,6 mmol) de la sal clorhidrato dipeptídica se disolvió luego en 140 cc de DMF, se enfrió hasta 0°C, y se trató con Boc-Thr(Bzl)-OSu (8,8 g, 21,6 mmol) seguido de 3,5 cc de  $\text{Et}_3\text{N}$ . Se adicionaron unas pocas gotas de  $\text{Et}_3\text{N}$  para mantener una condición ligeramente básica mientras se agitaba la mezcla durante 24 horas mas

a 25°C. Se acidificó con 5 cc de HOAc y luego se diluyó con un gran volumen de agua. Se recogió el producto bruto sólido precipitado, se disolvió en EtOAc, se lavó con H<sub>2</sub>O, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta sequedad, dejando una masa sólida y vitrea. La cristalización en EtOAc y éter de petróleo dió 13,8 g (83,7%) de Boc-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH; punto de fusión 110-112°C;  $[\alpha]_D^{25} = +19,45^{\circ}$  (c = 1, EtOAc).

Se trató Boc-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (41,5 g, 54 mmol) con 500 cc de HCl 3,55 N recién preparado en THF durante 25 minutos y se evaporó hasta obtener un jarabe que se re-evaporó dos veces con THF fresco. El residuo oleoso solidificó cuando se trató con éter. Este se recogió y lavó con éter, lo que dió 37,4 g de la sal clorhidrato bruta del tripéptido, se disolvió en 500 cc DMF, se enfrió hasta 0°C, y se trató con Boc-Ile-OSu (17,4 g, 53 mmol), seguido de 16 cc de Et<sub>3</sub>N. Se agitó la mezcla a 25°C durante una noche en cuyo tiempo se adicionó mas Et<sub>3</sub>N en pequeñas porciones (6,2 cc en total) para mantener un estado ligeramente básico. Se filtró la mezcla resultante y se evaporó el filtrado hasta obtener un aceite que se extrajo en EtOAc, se lavó con HOAc al 5%, H<sub>2</sub>O, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó; lo que dió un aceite amarillento. Este se cristalizó en EtOAc y éter de petróleo. El sólido bruto así obtenido (39,6 g, punto de fusión 140-142°C se encontró contaminado con varias impurezas poco importantes. El material se cromatografio luego en una columna de gel de sílice (70-230 mallas, 4,7 x 67 cm) utilizando en calidad de eluyente CHCl<sub>3</sub>/MeOH (95:5, v/v). Las fracciones conteniendo el producto deseado (controlado mediante TCl) se depositaron y se evaporaron, lo que dió un producto oleoso que se crista-

lizó en  $\text{CHCl}_3$  y éter de petróleo. Rendimiento: 19,1 g (41,2%) de Boc-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH; punto de fusión 144-146°C;  $[\alpha]_D^{25} = +2,40^\circ$  (c = 1,  $\text{CHCl}_3$ ).

Se trató Boc-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (0,439 g, 0,496 mmol) con HCl 4N en THF durante 30 minutos y se procedió a la elaboración final en la forma usual, lo que dió 0,39 g de HCl.H-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH. Luego se disolvió Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub> (0,59 g, 0,492 mmol) en 6 cc de DMF, se enfrió hasta -25°C, y se trató con 0,57 cc de HCl 4,3 N en THF (2,46 mmol) seguido inmediatamente de 0,1 cc de i-amilnitrito (0,74 mmol). Después de agitación -20°C - -25°C durante 30 minutos se hizo descender la temperatura hasta -35°C al tiempo que se adicionaban 0,42 cc de Et<sub>3</sub>N y HCl.H-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (0,39 g, preparado antes). Se agitó la mezcla a -20°C durante 30 minutos y luego a 4°C durante 48 horas, en cuyo tiempo se adicionó de vez en cuando Et<sub>3</sub>N para mantener el pH alrededor de 7,5. Luego se diluyó la mezcla con 250 cc de HOAc al 5% y el producto sólido formado se recogió y lavó con H<sub>2</sub>O, MeOH, éter, y se secó sobre pellas de NaOH en vacío, lo que dió 0,82 g de material bruto (punto de fusión 244-254°C). Este se disolvió en DMSO y precipitó con la adición de MeOH. Rendimiento: 0,698 g (81,7%) de Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH; punto de fusión 268-271°C.

Se enfrió a -20°C H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub> (0,408 g, 0,68 mmol) suspendido en 10 cc de DMF y se trató con HCl 5,43 N recién preparado (0,627 cc, 3,4 mmol) seguido de i-amilnitrito al 10% en DMF (1,39 cc 1,03 mmol). Después de agitación durante 30 minutos se en-

frió hasta  $-30^{\circ}\text{C}$  al tiempo que se adicionaban  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,476 cc, 3,4 mmol) seguido de la sal TFA del decapeptido H-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr-(Bzl)-Thr(Bzl)Lys(Z)-OH (1,334 g, 0,68 mmol).

5                    Se agitó la mezcla a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y luego a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 días en cuyo periodo de tiempo se adicionó mas  $\text{Et}_3\text{N}$  y DMSO para mantener la mezcla reaccional en un estado ligeramente básico y para preservar la formación de gel. Se vertió la mezcla reaccional en HOAc al 5%  
10 (300 cc) y se recogió el precipitado sólido formado, se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, éter, y se secó, lo que dió 1,49 g de material fundente a  $296-299^{\circ}\text{C}$ . El producto se reprecipito en DMSO con MeOH. Rendimiento: 1,40 g (85,37%) de  $\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Asp}(\text{OBzl})-\text{Ala}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Asp}(\text{OBzl})-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Glu}(\text{OBzl})-\text{Ile}-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Thr}(\text{Bzl})-\text{Lys}(\text{Z})-\text{OH}$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +6,37^{\circ}$  ( $c = 1$ , DMSO).

                  El tetradecapeptido obtenido (1,35 g, 0,558 mmol) se agitó con HOBT. $\text{H}_2\text{O}$  (0,188 g, 1,23 mmol) durante unos pocos minutos en una mezcla de 15 cc de DMF y 15 cc de  
20 DMSO. Luego se enfrió la mezcla en un baño de hielo al tiempo que se adicionaba DCC (0,126 g, 0,614 mmol) y se prosiguió la agitación durante 24 horas a la misma temperatura. En un matraz separado se trató Boc-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-  
25 -Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl (4,0 g, 1,42 mmol) con 40 cc de TFA durante 25 minutos y la sal de TFA del tetradecapeptido siguiente se precipitó rápidamente con la adición de un gran volumen de éter. El sólido formado se recogió y lavó a fondo con éter, lo que dió 3,74 g de polvo blanco (sal de TFA  
30 del tetradecapeptido C-terminal). Parte de este material (1,567 g, 0,5583 mmol) se adicionó al éster activo derivado

del tetradecapéptido amino-terminal tal como se ha prepara-  
do anteriormente en una mezcla de DMF-DMSO. Se adiciona-  
ron unas pocas gotas de NMI para llevar el pH de la mezcla  
reaccional a 7,5-8,0, y se prosiguió la agitación durante  
5 1 hora a 0°C y luego durante 5 días a 25°C. Luego se vir-  
tió la mezcla reaccional en 1,5 litro de ácido acético al  
5%. El producto precipitado se lavó a fondo con H<sub>2</sub>O, MeOH  
y éter lo que dió 2,21 g del producto deseado, H<sub>3</sub>C-CO-Ser-  
(Bzl)-Asp(OBzl)-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-  
10 -Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-  
Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu-  
(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl, fundente sobre  
300°C.

Se disolvió el octacosapéptido protegi-  
do (2,21 g, 0,435 mmol) en 8 cc de TFA, se mezcló con 4 cc  
de anisol y se agitó con HF anhidro a 0°C durante 30 minu-  
tos. Se separaron los ácidos a 0°C (destilación en vacío)  
y se disolvió el residuo sólido que quedó en 200 cc de H<sub>2</sub>O,  
se lavo dos veces con éter, se evaporó hasta la mitad del  
20 volumen y se liofilizó, lo que dió 1,1 g de producto bru-  
to. Este se purificó pasando a través de una columna Sepha-  
dex<sup>R</sup> G-10 (3 x 80 cm; HOAc 0,2M) y luego una columna DEAE-  
Sephadex<sup>R</sup> (3 x 75 cm) eluyéndose con concentraciones en  
aumento de acetato amónico (pH 7,0, 0,025 M, 0,25M) seguido  
25 de ácido acético diluido. Se depositaron las fracciones -  
conteniendo el material deseado y se liofilizaron, lo que  
dió 0,281 g de H<sub>3</sub>C-CO-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-  
-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Glu-Glu-  
-Ala-Glu-Asn (alfa<sub>1</sub> timosina) en forma de un polvo blanco  
30 amorfo.

Con el enfoque isoeléctrico de gel de  
acrilamida el material sintético migra de idéntica forma

que la alfa<sub>1</sub> tinosina natural aislada de la glandula tiro  
bovina (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74, 725 (1977)).

EJEMPLO 2.

5 Se disolvió Boc-Ala-Ala-OH (7,23  
g, 27,8 mmol) en una mezcla de 200 cc de MeOH y 20 cc de H<sub>2</sub>O.  
Se adicionó solución de Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (acuosa al 20%) hasta que el  
pH alcanzó 7,0 (alrededor de 30 cc) y se evaporó la solu-  
ción neutra resultante hasta sequedad. El residuo se re-  
evaporó dos veces con DMF (150 cc) y el sólido gelatinoso  
10 que quedó se agitó en 120 cc de DMF con bromuro de bencilo  
(7,2 g, 42 mmol) durante 15 horas. Luego se separó el di-  
solvente mediante evaporación y se trató el residuo con  
500 cc de agua. El producto precipitó en forma de un acei-  
te que solidificó gradualmente con el reposo. Se recogió  
15 en EtOAc (400 cc), se lavó con H<sub>2</sub>O (3x), se secó sobre Na<sub>2</sub>-  
SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta obtener un jarabe que mediante tra-  
tamiento con éter de petróleo empezó a cristalizar. El pro-  
ducto se recristalizó en EtOAc y éter de petróleo, lo que  
dió 7,2 g (73,8%) de Boc-Ala-Ala-OBzl; punto de fusión 71-  
20 -73°C.

Se trató Boc-Ala-Ala-OBzl (6,0 g,  
17,15 mmol) con 380 cc de HCl 4 N recién preparado en THF  
durante 30 minutos. Se separó por evaporación el ácido en  
exceso y el disolvente y se reevaporó el jarabe restante dos  
25 veces con THF fresco. El residuo solidificó inmediatamente  
cuando se trató con éter. Este se recristalizó en MeOH  
y éter, lo que dió 4,30 g (76,4%) de HCl.H-Ala-Ala-OBzl;  
[alfa]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -38,86° (c = 1, MeOH).

Se disolvió HCl.H-Ala-Ala-OBzl  
30 (4,25 g, 14,83 mmol) en DMF (60 cc), se enfrió hasta 0°C, y  
se agitó con Boc-Asn-OH (3,45 g, 14,83 mmol), HOBT (4,02 g,

28,6 mmol), NMM /2 cc) y DCC (3,37 g, 16,35 mmol) a 0°C durante 2 horas y luego a 25°C durante 20 horas. De vez en cuando se adicionó mas NMM para mantener la mezcla reaccional ligeramente básica. Se separaron por filtración los sub-productos insolubles y se evaporó el filtrado hasta sequedad. El residuo oleoso solidificó inmediatamente cuando se trató con agua. Este se recogió en EtOAc, se lavó con H<sub>2</sub>O (3 x), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó hasta menor volumen cuando el producto empezó a cristalizar. Se adicionó un volumen igual de éter de petróleo y la mezcla se dejó reposar durante una noche. El producto bruto se recrystalizó en THF y éter de petróleo, lo que dió 5,2 g (75,6%) de Boc-Asn-Ala-Ala-OBzl; punto de fusión 153-155°C;  $[\alpha]_D^{25} = -55,61$  (c = 1, MeOH).

Se trató Boc-Asn-Ala-Ala-OBzl (2,2 g, 4,75 mmol) con 220 cc de HCl 4,0N en THF durante 30 minutos. Se separó por evaporación el ácido en exceso y el disolvente y se reevaporó el residuo dos veces con THF fresco. El producto oleoso solidificó cuando se trató con éter. Se trituró con mas éter fresco y se recogió lo que dió un polvo blanco (1,85 g). La sal clorhidrato así obtenida se disolvió en 40 cc de DmF y se enfrió a 0°C cuando se adicionó H<sub>3</sub>C-CO-Ser-(Bzl)-OH.DCHA (1,97 g, 4,75 mmol). Después de agitarse a 0°C durante 30 minutos se observó la precipitación de DCHA.HCl y se adicionó HOBT (1,19 g) seguido de DCC (1,03 g, 5,23 mmol). Luego se ajustó la reacción a pH 7,5 con unas pocas gotas de NMM y se agitó a 0°C durante 2 horas y luego a 25°C durante una noche. Se separó el sub-producto insoluble mediante filtración y se evaporó el filtrado hasta obtener una masa sólida ligeramente coloreada. Se lavó a fondo con H<sub>2</sub>O y EtOAc lo que dió un polvo de color ante que se cristalizó en DMF

(40 cc) y en iso-propanol (500 cc). Rendimiento: 1,57 g (56,9 %) de  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-OBzl$ ; punto de fusión 213-215°C;  $[\alpha]_D^{25} = -23,11^\circ$  (c = 1, DMSO).

5 Se disolvió  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-$   
-Ala-OBzl (1,57 g, 2,69 mmol) en 20 cc de DMF y se agitó  
con 2 cc de  $H_2NNH_2$  durante 18 horas. Se recogió el produc-  
to sólido formado y se lavó a fondo con DMF, EtOH y éter,  
lo que dió 1,22 g (89,6%) de  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-$   
ANNH<sub>2</sub>; punto de fusión 262-264°C;  $[\alpha]_D^{25} = -26,7^\circ$  (c = 1,  
10 DMSO).

Se trató Boc-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser  
(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH (0,698 g)  
0,358 mmol) con 10 cc de TFA durante 30 minutos y la sal  
peptídica se precipitó con éter. Se recogió en un filtro  
15 de succión se lavó con éter y se secó, lo que dió 0,652 g  
de material (0,333 mmol como sal de TFA). En un matraz se-  
parado se suspendió  $H_3C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-HNNH_2$  (0,17  
g, 0,335 mmol) en 7 cc de DMF y se trató con 0,27 cc de HCl  
6,18N en THF a -20°C. A la mezcla se adicionó 0,68 cc de i-  
20 -amilnitrito al 10% en DMF y se agitó la solución a la misma  
temperatura durante 30 minutos. Se hizo descender la tempera-  
tura hasta -30°C al adicionarse 0,234 cc de Et<sub>3</sub>N (1,67 mmol)  
seguido de la sal de TFA de decapeptido (0,652 g) antes prepa-  
rada. Se diluyó la mezcla con 3 cc de DMSO a -20°C y se ajustó  
25 hasta un estado ligeramente básico (pH 7,5) con unas pocas  
gotas de Et<sub>3</sub>N. Se agitó a -20°C durante 30 minutos y luego  
a 4°C durante 5 días. Durante este periodo de tiempo se adi-  
cionó mas DMSO (5 cc) y Et<sub>3</sub>N para mantener las condiciones li-  
geramente básicas y para impedir que la mezcla reaccional geli-  
30 fique. Luego se virtió toda la solución en HOAc al 5% (250 cc)  
para obtener un precipitado blanco que se recogió, lavó con

H<sub>2</sub>O, MeOH, éter, y se secó. El producto bruto (0,702 g; punto de fusión 290-291°C) se precipitó en DMSO con MeOH. Rendimiento: 0,348 g (42,0%) de H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-OH; punto de fusión 296-298°C (desc.) [alfa]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +3,77° (c = 1, DMSO).

Se agitó el producto obtenido (0,866 g, 0,373 mmol) con HOBT, H<sub>2</sub>O (0,126 g, 0,82 mmol) en una mezcla de DMSO (6 cc) y DMF (6 cc) y se enfrió en un baño de hielo. Se trató la mezcla con DCC (0,085 g, 0,411 mmol) y luego se agitó a 0°C durante 24 horas. Luego se mezcló con la sal de TFA del tetradecapéptido preparada como en el ejemplo 1B.d) (1,05 g, 0,373 mmol) y 2 cc más de DMSO.

Se adicionaron unas pocas gotas de NMM para llevar el pH a 7,5-8,0 y se prosiguió la agitación a 0°C durante 1 hora y luego a 25°C durante 5 días. La elaboración final tal como se ha descrito en el ejemplo 1B.d) dió 1,5775 g del octacosapéptido totalmente protegido H<sub>3</sub>C-CO-Ser(Bzl)-Asn-Ala-Ala-Val-Asp(OBzl)-Thr(Bzl)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-Glu(OBzl)-Ile-Thr(Bzl)-Thr(Bzl)-Lys(Z)-Asp(OBzl)-Leu-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Lys(Z)-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Val-Val-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ala-Glu(OBzl)-Asn-OBzl.

El octacosapéptido totalmente protegido (1,57 g 0,32 mmol) se disolvió en 10 cc de TFA que contenía 3 cc de anisol. Se agitó la mezcla con 45 cc de HF a 0°C durante 30 minutos y luego se procedió a la elaboración final tal como se ha descrito en el ejemplo 1B.d). La purificación en columnas Sephadex<sup>R</sup> G-10 y DEAE-Sephadex<sup>F</sup>, tal como se ha descrito antes, dió 0,283 g de H<sub>3</sub>CO-Ser-Asn-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn [alfa<sub>1</sub> (Asn<sup>2</sup>)-timosina] en forma de un producto amorfo blanco. El compuesto migro a la posición ligeramente menos ácida que la alfa<sub>1</sub> timo-

sina en isoelectroenfoque de gel acrilamídico de conformidad con la diferencia de la estructura.

= . =

5

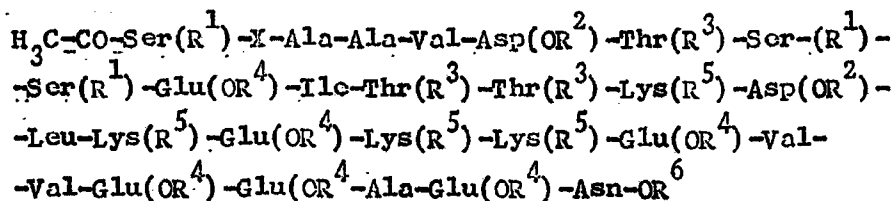
### REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones:

10

1.- Un procedimiento para la preparación de alfa<sub>1</sub> timosinas y sus sales aceptables en farmacia caracterizado porque comprende separar los grupos protectores de un octacosapéptido protegido de la secuencia

15



en donde

20

X es Asn o Asp(OR<sup>2</sup>);

R<sup>1</sup> es un grupo protector convencional para el grupo hidroxílico del radical de serina;

R<sup>2</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>6</sup> son grupos protectores de grupo carboxílico convencionales;

25

R<sup>3</sup> es un grupo protector convencional para el grupo hidroxílico de la treonina y

R<sup>5</sup> es un grupo protector convencional para el grupo omega-amínico del radical de lisina, por tra-

30

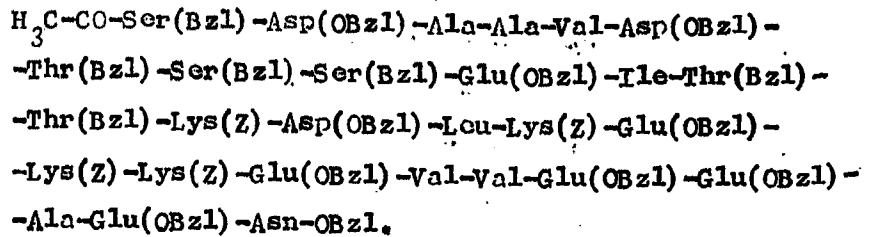
tamiento a baja temperatura con un ácido anhídrido, de preferencia fluoruro de hidrógeno opcionalmente en presencia de anisol,

y si se desca, convertir el compuesto obtenido en una sal

aceptable en farmacia.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende separar los grupos protectores de un octacosapéptido protegido de la secuencia

5



10

(Ia)

en donde

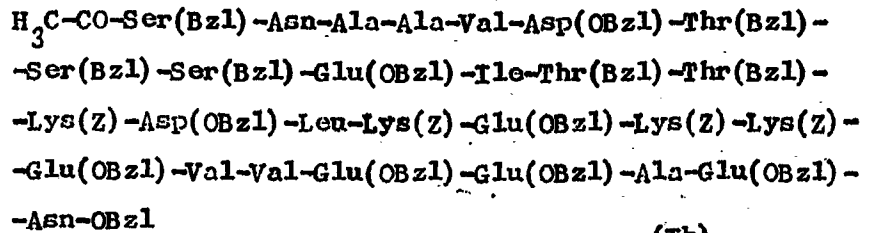
Bzl es bencilo, y

Z es benciloxicarbonilo.

15

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se obtiene la  $\alpha_1$ [Asn<sup>2</sup>]-timosina separando los grupos protectores de un octacosapéptido protegido de la secuencia

20



(Ib)

25

en donde

Bzl es bencilo, y

Z es benciloxicarbonilo.

4.- Un procedimiento para la preparación de  $\alpha_1$ timosinas.

30

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 42 hojas folia-

das y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 21 ABR. 1978

p.a.: JAIME ISERN  
p. p.



Firmado: JESUS PICAZO

mc.