

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

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

5 ENE. 1979

11	NUMERO	10	A1
21	471.793		
22	FECHA DE PRESENTACION		
	17-7-1978		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	RI-640		18-7-1977		Hungría

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			CO7C//A61K		

54	TITULO DE LA INVENCION
	"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR PEPTIDOS"

71	SOLICITANTE (S)
	RICHTER GEDEON VEGYÉSZETI GYAR RT. (23016-67 FG/Czj)

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	Gyömrői ut, Budapest X., Hungría

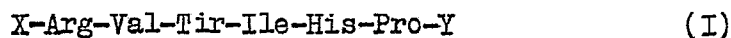
72	INVENTOR (ES)
	Dr. Lajos KISFALUDY, Sra. György NYÉKI, Sra. László SZIRMAI, Dr. Egon KÁRPÁTI, Dr. Katalin GIDAI y Dr. László SZPORNÝ

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	DON ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.-69.519)

jga

1 La presente invención se refiere a nuevos péptidos de fórmula general I:



5 que tienen propiedades antagonistas de la angiotensina II, así como a un procedimiento para prepararlos. En la fórmula general I

X es un radical derivado de un ácido α -aminooxicarboxílico alifático, e

10 Y representa un radical derivado de un ácido α -aminocarboxílico alifático.

Los representantes preferidos de los radicales derivados de un ácido α -aminooxicarboxílico alifático representado por X son los grupos aminooxiacetilo y α -aminooxi-
15 propionilo, mientras que Y representa preferiblemente un grupo leucilo, isoleucilo, alanilo o treonilo.

Las sales de adición de ácido y los complejos de los péptidos que tienen la fórmula general I también están
20 dentro del ámbito de la invención.

La angiotensina II es un octapéptido que tiene actividad hipertensora. En el organismo, la angiotensina I se prepara a partir de α -globulina producida por el hígado mediante una enzima llamada renina, desprendida por el ri-
25 ñón. En el organismo, este compuesto se convierte en angiotensina II.

El primer análogo de la angiotensina II fué señalado por primera vez en 1970. Se halló que este compuesto actuaba como inhibidor competitivo específico de la angio-
30 tensina II en ensayos en vivo y también in vitro (G.R.

1. Marshall y otros: Proc.Natl.Acad.Sci.USA 67 1624 (1970);
P.A.Khairralah y otros: J.Med.Chem. 13, 181 (1970)). Esta
observación ha provocado un interés en aumento y ha estimu
lado a numerosos laboratorios para sintetizar y observar
nuevos análogos de angiotensina II que poseen propiedades
5 antagonistas y se pueden usar, por tanto, para diagnosti-
car, o incluso tratar, hipertensiones dependientes de la
renina. En los mismos principios del trabajo de investiga-
ción resultó que los análogos en los que el grupo 8-Fe es-
taba sustituido por un aminoácido que tenía una cadena se-
10 cundaria alifática eran los compuestos más prometedores pa-
ra este fin. Este cambio en la estructura de la molécula
de angiotensina II significa en la práctica, en concreto,
la desaparición de la actividad agonista y la aparición de
una fuerte actividad antagonista (D.Gagnon y otros: Br.J.
15 Pharmacol. 43, 409 (1971); D.T.Pals y otros: Circ.Res. 29,
664 (1971)). La actividad antagonista se puede aumentar
considerablemente cuando - además de la modificación rea-
lizada en posición 8 - el grupo 1-Asp se reemplaza por una
unidad Sar (D.T.Pals y otros: Circ.Res. 29, 673 (1971)).
20 La (Sar¹,Ala⁸)-angiotensina II preparada de esta forma ya
ha sido puesta en circulación. Las propiedades ventajosas
de este compuesto se atribuyen a una disminución de la des-
composición enzimática en vivo, y a su mayor afinidad para
los puntos receptores.

25 La suposición de que los análogos antagonistas
de la angiotensina II pueden hallar aplicación en la diag-
nosis, y en algunos casos en el tratamiento, de las hiper-
tensiones dependientes de la renina /D.Ganton y F.Gross:
30 Med.Klin. 71, 2043 (1976); J.L.Marx: Science 194, 821

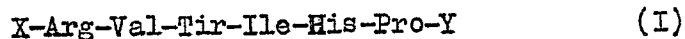
1 (1976); P.Needelman y G.R.Marshall: Fed.Proc. 35, 2486
(1976) 7.

5 La comparación de la estructura y actividad biológica de los análogos de la angiotensina II preparados hasta ahora ha proporcionado alguna información muy importante para la interpretación de la actividad agonista-antagonista
M.C.Khosla y otros: "Handbook of Experimental Pharmacology" (Manual de farmacología experimental), vol. 37, I.H.Page y P.M.Bumpus editores, 1974; G.R.Marshall: Fed.Proc. 35, 2494 (1976) 7.

10 En el centro del presente trabajo de investigación está la preparación de nuevos antagonistas desprovistos de efectos secundarios indeseados, y que poseen un periodo-mitad biológico más largo M.C.Khosla y otros: J.Med. Chem. 19, 244 (1976); ibid. 20, 253 (1977) 7.

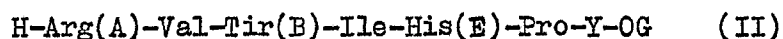
15 Se ha hallado ahora que cuando se sustituye el resto de 8-fenilalanina de la molécula de angiotensina II por un radical de ácido α -aminocarboxílico alifático, y simultáneamente se une un radical de ácido α -aminooxicarboxílico alifático a la posición 1, se obtienen nuevos inhibidores competitivos con la angiotensina II, que disminuyen
20 considerablemente la hipertensión inducida por la renina en ensayos en vivo, incluso en el caso de administración subcutánea.

25 Según la invención, los compuestos de fórmula general I:



30 donde X e Y son como se han definido antes,

1 se preparan haciendo reaccionar un derivado heptapéptido reactivo de fórmula general II:



5 donde

A representa un grupo adecuado para protección temporal del grupo guanidino de Arg,

B representa un grupo adecuado para protección temporal del grupo hidroxilo aromático de Tir,

10 E es un grupo adecuado para protección temporal del grupo imidazolo de His,

G representa hidrógeno o un grupo adecuado para protección del grupo carboxilo del C terminal del aminoácido alifático, el cual grupo protector es estable bajo condiciones suavemente ácidas, pero puede ser escindido mediante ácidos o bases fuertes, e

15

Y tiene el mismo significado antes definido,

con un derivado reactivo de ácido aminooxicarboxílico de fórmula general III:

20



donde

X es como se ha definido antes,

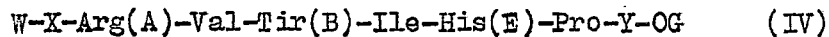
25 W es un grupo protector que se puede eliminar por acidólisis, y

M representa un grupo hidroxilo o un grupo activador conocido por sí mismo,

30

y escindiendo los grupos protectores de los compuestos de

1. fórmula general IV obtenidos:



donde

5 W, X, Y, A, B, E y G son como se han definido antes, selectivamente, uno tras otro o simultáneamente, en una sola etapa de reacción, y, si se desea, convirtiendo un compuesto de fórmula general I obtenido en una sal de adición de ácido o un complejo del mismo.

10 En los compuestos de fórmula general II A representa preferiblemente un grupo nitro o tosilo, B representa preferiblemente un grupo bencilo o bencilo sustituido; y E es preferiblemente un grupo dinitrofenilo. En los compuestos de partida de fórmula general III, W representa pre-
15 feriblemente un grupo benciloxicarbonilo o terc-butoxicarbonilo, X significa preferiblemente un grupo aminooxiacetilo o -aminooxipropionilo, y M representa preferiblemente un grupo pivaloiloxi, nitrofenoxi, 2,3,5-triclorofenoxi, pentaclorofenoxi, pentafluorofenoxi, N-succinimidoxi o azido.
20 do.

Los derivados heptapéptidos reactivos de fórmula general II usados como materiales de partida en la síntesis de los compuestos de la presente invención se pueden preparar por cualquier método conocido en la química de
25 los péptidos. Un método apropiado está descrito, por ejemplo, en la memoria descriptiva de la patente húngara nº 168.431. Según este método, los grupos funcionales de las cadenas secundarias se protegen con grupos que son esta-
30 bles bajo las condiciones de la acidólisis efectuada cuan-

1 do se eliminan los grupos protectores tras la copulación.

Según una realización preferida del procedimiento según la invención, para la protección temporal del grupo carboxilo del C terminal del aminoácido se usa el grupo p-nitrobencilo (NB); el grupo hidroxilo de la tirosina se protege con un grupo bencilo (Bcl); para la protección del anillo de imidazol de la histidina se usa un grupo dinitrofenilo (Dnf); mientras que el grupo guanidino de la arginina se protege con un grupo tosilo (Tos). Todos estos grupos protectores son estables bajo condiciones suavemente ácidas, y en consecuencia el grupo t-butoxicarbonilo (Boc) del N terminal se puede eliminar sin riesgo de escindir esos grupos. La eliminación del grupo dinitrofenilo se puede efectuar por tiolisis, y los restantes grupos protectores se pueden escindir mediante fluoruro de hidrógeno.

Los compuestos de fórmula general I se pueden purificar de manera conocida por sí misma, preferiblemente por cromatografía de intercambio de iones con carboximetilcelulosa. Como resultado de esta tecnología, los compuestos se obtienen generalmente como polvos liofilizados, que se pueden transformar fácilmente a diversas sales o complejos.

La actividad antagonista de los compuestos que tienen la fórmula general I se ensayó en gatos macho narcotizados. La presión sanguínea se midió en la arteria cervical. Los ensayos se efectuaron introduciendo una infusión de Hipertensión (CIBA) en un repliegue femoral lateral, a velocidad de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. Cuando se estabilizó el aumento de presión sanguínea se administraron las solu

1 - ciones acuosa, fisiológica o que contiene vehículo, de los
compuestos de ensayo y Saralasin, en una sola dosis, intra-
venosa o subcutánea, y se midió la disminución de la pre-
sión de la sangre.

5 En la Tabla 1 se ilustra la disminución de la
presión de la sangre arterial bajo la influencia de una ad-
ministración intravenosa de los compuestos de ensayo. Para
comparación se usa Saralasin. Los datos expuestos en la Ta-
bla 1 se obtuvieron calculando la media de los resultados
de 6 experimentos. Los márgenes de error indican la disper-
sión del valor principal.

Tabla 1

15 Influencia de diversos análogos de la angiotensina II, ad-
ministrados por vía intravenosa, sobre la presión de la
sangre, bajo infusión i.v. de angiotensina II

Análogo	Disminución de la presión san- guínea (mmHg) tras administra- ción de	
	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20 $\mu\text{g}/\text{kg}$
	dosis i.v.	
(Aminooxiacetil ¹ , Leu ⁸)- -AngII	-33 \pm 3,6	-42 \pm 4,2
(D- α -aminooxipropionil ¹ , Leu ⁸)-AngII	-30 \pm 3,4	-38 \pm 3,8
(Aminooxiacetil ¹ , Ile ⁸)- -AngII	-28 \pm 2,0	-40 \pm 5,7
25 Saralasin	-41 \pm 2,5	-

30 Por los datos expuestos en la anterior Tabla I
se puede ver claramente que cada análogo de angiotensina

1 sustituido con un ácido α -aminocoxicarboxílico alifático en la posición 1 posee una significativa actividad de disminución de la presión de la sangre. La magnitud de la actividad es proporcional a la dosis empleada.

5 También se efectuaron ensayos en el caso de la administración subcutánea. Se debe observar que esta vía de administración de la angiotensina II o sus análogos no ha sido publicada en la bibliografía con anterioridad. Para administración subcutánea, una solución salina fisiológica que contenía el compuesto a ensayar fué suplementada con carboximetilcelulosa y gelatina, respectivamente. 10 Los resultados correspondientes a la media de cinco ensayos separados se exponen en la siguiente Tabla 2. Los márgenes de error son relativos al valor principal.

15 Tabla 2

Influencia de diversos análogos de la angiotensina II, administrados por vía subcutánea, sobre la presión de la sangre, bajo infusión i.v. de angiotensina II

20

25

30

1
5
10
15
20
25
30

Análogos	Dosis	Aditivo a la solución	Disminución de la presión sanguínea (mmHg) tras minutos			
			15	30	60	120
(Aminoacisacetyl, Leu ⁸)-AngII	200	CMC	-21±5,8	-26±7,2	-13±9,4	-5±7,8
	200	gelatina	-23±2,0	-21±2,2	-10±2,8	-1±5,1
(D-α-aminooxipropio- nil ¹ ,Leu ⁸)-AngII	200	CMC	-21±6,7	-24±5,7	-16±5,1	-1±4,0
	200	gelatina	-24±5,7	-21±5,6	-9±5,7	-3±8,8

1 Según los datos dados antes, los nuevos compues-
tos de la presente invención, administrados subcutáneamente,
disminuyen la presión sanguínea inducida intencionadamente,
de manera significativa, incluso 60 minutos después de la
administración.

5 Los péptidos según la invención, así como sus sa-
les y complejos farmacéuticamente aceptables, se usan para
fines farmacológicos en forma de composiciones farmacéuti-
cas usuales. El término "complejos farmacéuticamente acepta-
bles" de los péptidos según la invención se usa aquí para
10 hacer referencia a compuestos complejos formados con cier-
tos materiales orgánicos, por ejemplo, que dotan a los pép-
tidos de una actividad retardada. Son representantes típi-
cos de estos compuestos las gelatinas, carboximetilcelulo-
sas, ésteres de ácido algínico, poli(fluoroetnofosfatos),
15 polímeros de aminoácido y otros polímeros y copolímeros. Co-
mo sales farmacéuticamente aceptables se usan las sales usua-
les de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, p.ej.
el acetato.

20 Las composiciones farmacéuticas contienen los com-
puestos según la invención en mezcla con vehículos orgáni-
cos o inorgánicos adecuados para administración enteral o
parenteral. Así, las composiciones farmacéuticas se pueden
formular como liofilizados sólidos en los que se pueden usar
como vehículos diversos compuestos inertes, que no reaccio-
25 nen con los péptidos, p.ej. hidrocarburos. Cuando las compo-
siciones farmacéuticas se formulan como suspensiones o emul-
siones diluídas o concentradas, contienen también diversos
agentes conservadores y agentes estabilizantes.

30 Las composiciones farmacéuticas que contienen los

1 -compuestos según la invención se pueden usar para detección diferenciada de hipertensiones renales, así como en el tratamiento de cada síndrome causado por una presión sanguínea renal aumentada.

5 Mediante los siguientes ejemplos no limitativos se ilustran más detalles de la invención. Las abreviaturas usadas en los ejemplos corresponden a las usadas generalmente en la bibliografía (J.Biol.Chem. 247, 977 (1972)). Los α -aminoácidos se designan por la sílaba "O" puesta antes del símbolo correspondiente al aminoácido en cuestión. Así, por ejemplo, OGli representa ácido aminooxiacético; OAla representa ácido α -aminooxipropiónico, etc. 10 Otras abreviaturas son, por ejemplo: PFF = pentafluorofenilo, y Z = carbometoxi.

15 Durante el procedimiento según la invención, la evaporación se efectúa siempre en equipo Büchi Rotavapor. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato del Dr. Tottoli (fabricado por Büchi). La cromatografía en capa delgada se efectuó en placas de gel de sílice "Kieselgel nach Stahl" (E.Merck, Darmstadt). Los cromatogramas se re 20 velaron con las siguientes mezclas disolventes:

1. acetato de etilo: (mezcla 20:6:11 de piridina/ácido acético/agua) = 95:5
2. acetato de etilo: (mezcla 20:6:11 de piridina/ácido acético/agua) = 90:10
- 25 3. acetato de etilo: (mezcla 20:6:11 de piridina/ácido acético/agua) = 80:20
4. acetato de etilo: (mezcla 20:6:11 de piridina/ácido acético/agua) = 70:30
- 30 5. mezcla 4:1:5 de n-butanol/ácido acético/agua

- 1 6. mezcla 30:6:20:24 de n-butanol/ácido acético/piridina/
/agua
7. mezcla 1:1:1:1 de n-butanol/acetato de etilo/ácido
acético/agua

5 En los ejemplos, cuando se indican los valores R_f , se hace referencia a los números de serie de los anteriores sistemas disolventes.

La electroforesis en papel se realizó en equipo horizontal IMIM, de media tensión, con papel MN 214, en una solución tampón de pH = 1,9, además de ácido glutámico. Tensión: 450 V; tiempo: 3 horas.

10

Los cromatogramas en capa delgada se revelaron parcialmente con una solución de ninhidrina, y parcialmente con una técnica usual de cloración efectuada con solución de o-tolidina-KI.

15 El producto final se purificó como se describe a continuación:

Las sales de los péptidos libres con fluoruro de hidrógeno se purificaron en una resina "Sephacryl S-200 Sperfine" (Pharmacia, Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) por una técnica de elución con gradiente, efectuada con una solución de acetato amónico 0,01 M (pH = 4,5) y subsiguientemente 0,4 M (pH = 6,7). Los eluidos se registraron con un aparato "LKB Uvicord II" (LKB, Uppsala, Suecia), mediante un colector automático de fracciones.

20

La fracción principal se purificó más como se describe a continuación: 0,5 litros de una columna de carboximetilcelulosa (CMC-52) se equilibró con la primera solución tampón antes descrita. Se disolvieron 0,5 g de un péptido en 4 ml de un tampón de acetato amónico 0,01 M. La

25

30

1 solución obtenida se superestratificó sobre la columna de
carboximetilcelulosa. Se mezclaron 1,5 litros de una solu-
ción de acetato amónico 0,01 M con 1,5 litros de una solu-
ción de acetato amónico 0,4 M, en un agitador de gradiente,
5 y se efectúa la elución con gradiente. La velocidad de flu-
jo se ajustó a 25 ml/hora, y se recogieron fracciones de 10
ml. El eluido que salía de la columna se registró continua-
mente mediante un aparato LKB Uvicord-II. El producto final
purificado se obtuvo liofilizando la fracción principal.

10

Ejemplo 1(Aminoxiacetil¹,Ile⁸)-angiotensina IIEtapa 1Boc-Arg(Tos)-Val-Tir(Bcl)-Ile-His(Dnf)-Pro-
-Ile-ONB

15

4,5 g (15 mmoles) de Ile-ONB se disuelven en
50 ml de cloroformo, y se añaden a la solución 2,1 ml de
trietilamina y 3,81 g (10 mmoles) de Boc-Pro-OPFF. La
mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente du-
rante 20 minutos, y luego se agita con agua y una so-
lución acuosa de ácido cítrico al 10%. Tras secado y
20 evaporación se obtiene un péptido protegido ($R_f^1 = 0,8$)
que se disuelve inmediatamente en 20 ml de una solución
8 M de ácido clorhídrico en dioxano. La solución se
deja reposar durante 10 minutos, y se diluye con éter

25

seco y se evapora. El clorhidrato de dipéptido libre obte-
nido ($R_f^2 = 0,44$) se disuelve en 30 ml de cloroformo, el va-
lor del pH se ajusta a 8 con trietilamina, y se añaden 8,8
g (15 mmoles) de Boc-His(Dnf)-OPFF. Tras hora y media se

30

añaden 1,65 ml de N,N-dimetilaminoetilamina a la solución,

1 y tras 15 minutos se agita la mezcla de reacción con una
solución acuosa de ácido cítrico al 10%, solución acuosa
1 N de ácido clorhídrico, con agua, y finalmente con una
solución acuosa de hidrogenocarbonato sódico al 5%. Tras
secado y evaporación, el tripéptido protegido ($R_f^1 = 0,50$)
5 obtenido se disuelve - sin aislarlo - en 20 ml de una so-
lución 8 M de ácido clorhídrico en dioxano, y el tripépti-
do libre ($R_f^4 = 0,25$) se precipita por adición de éter seco.
El precipitado obtenido se separa por filtración y se lava
con éter. Luego se disuelve inmediatamente en una mezcla de
10 50 ml de cloroformo y 20 ml de dimetilformamida, se ajusta
el pH a 8 con trietilamina y se añaden a la solución 6,0 g
(15 mmoles) de Boc-Ile-OPFF. Tras 30 minutos, el disolven-
te se reemplaza por acetato de etilo, y la mezcla se agita
con una solución acuosa de ácido cítrico al 100% y con una
15 solución acuosa 1 M de ácido clorhídrico, y finalmente con
agua. El secado y subsiguiente evaporación del extracto
acuoso proporciona un tripéptido protegido ($R_f^2 = 0,65$),
que luego se aísla mediante una mezcla 1:9 de éter y n-hexa-
no. Se disuelve luego en 25 ml de una solución 8 M de ácido
20 clorhídrico en dioxano, y el tetrapéptido libre ($R_f^4 = 0,41$)
se precipita tras 30 minutos, mediante éter seco. El preci-
pitado se separa por filtración y se lava con éter. Se di-
suelve inmediatamente en una mezcla 1:1 de dimetilformami-
da y cloroformo (70 ml), se ajusta el pH de la solución a
25 8 con trietilamina, y se añaden 6,0 g (11,5 mmoles) de
Boc-Tir(Bcl)-OPFF. Se deja reposar la solución durante 15
minutos, tras lo cual el disolvente se reemplaza por aceta-
to de etilo. Se añaden 0,66 ml de N,N-dimetilaminoetilamina,
30 y tras 15 minutos la mezcla se agita con una solución acuo-

1 sa de ácido cítrico al 10%, con ácido clorhídrico acuoso
1 M, y finalmente con agua. El secado y la evaporación del
producto obtenido proporcionan un pentapéptido protegido
($R_f^2 = 0,59$) que se precipita con éter, se separa por fil-
tración y se lava con éter. Luego se disuelve en 20 ml de
5 una solución 8 M de ácido clorhídrico en dioxano, y se deja
reposar durante 15 minutos. El pentapéptido libre ($R_f^4 = 0,4$)
se precipita luego con éter seco, se separa por filtración
y se lava con éter. Se disuelve inmediatamente en 50 ml de
dimetilformamida, se ajusta el valor del pH de la solución
10 a 8 con trietilamina, y se añaden 4,62 g (12 mmoles) de
Boc-Val-OPFF. Tras una hora el disolvente se reemplaza por
cloroformo, y la solución se agita con una solución acuosa
de ácido cítrico al 10%, solución acuosa 1 M de ácido clor-
hídrico, y finalmente con agua. El secado y la evaporación
15 de la mezcla proporcionan un hexapéptido protegido ($R_f^2 =$
0,56), que luego se aísla mediante éter y se lava con éter.
El producto se disuelve en 20 ml de una solución 8 M de
ácido clorhídrico en dioxano, y el hexapéptido libre
($R_f^4 = 0,47$) se precipita con éter seco. El precipitado se
20 separa por filtración y se lava con éter. Se disuelve in-
mediatamente en 50 ml de dimetilformamida, y el valor del
pH de la solución se ajusta a 8 con trietilamina. Se aña-
den 7,2 g (12 mmoles) de Boc-Arg(Tos)-OPFF, la mezcla se
25 agita durante una hora, y el disolvente se reemplaza por
cloroformo. La solución obtenida se agita con una solución
acuosa de ácido cítrico al 10%, solución acuosa 1 N de áci-
do clorhídrico, y finalmente con agua. Tras secado y evapo-
ración, el residuo se tritura con éter, dando 12,4 g del
30 correspondiente heptapéptido protegido (80% del teórico).

1 Punto de fusión: 189 a 192°C; $R_f^2 = 0,55$.

Etapa 2

Boc-OGli-Arg(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Ile-OH

5 Se disuelven 3,1 g (2 mmoles) de Boc-Arg(Tos)-
-Val-Tir(Bcl)-Ile-His(Dnf)-Pro-Ile-ONB en 5 ml de dimetil-
formamida, y se añaden 2,9 ml de 2-mercaptoetanol. Tras una
hora, el péptido se precipita con éter seco, se filtra, se
lava con éter y se purifica con una precipitación por metanol/éter. Se obtienen 2,0 g (74%) de Boc-Arg(Tos)-Val-Tir-
10 (Bcl)-Ile-His-Pro-Ile-ONB ($R_f^2 = 0,11$). El producto se disuelve en 30 ml de una mezcla 5:1:1 de metanol, ácido acético y agua, y se añade 1,0 g de un catalizador de paladio al 10% sobre carbón vegetal. Luego se burbujea hidrógeno por la solución durante 5 horas, y se separa el catalizador por filtración, tras lo cual la solución se evapora y
15 tritura con éter. Se obtienen 1,22 g (75%) de un heptapéptido parcialmente protegido, de fórmula Boc-Arg(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Ile-OH, $R_f^5 = 0,8$. Se disuelven 0,6 g (0,5 mmoles) del producto obtenido en 5 ml de una solución 8 M de ácido clorhídrico en dioxano, y tras 20 minutos de agitación se separa por filtración el heptapéptido libre
20 ($R_f^4 = 0,1$), y se lava con éter. Se disuelve inmediatamente en 15 ml de dimetilformamida, el valor del pH se ajusta a 8 con trietilamina y se añaden 0,45 g (1,2 mmoles) de Boc-OGli-OPFF. Tras 30 minutos la mezcla de reacción se
25 evapora, el residuo se disuelve en 30 ml de una mezcla 3:1 de cloroformo y dimetilformamida, y la solución se agita con una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, y subsiguientemente con agua. El extracto se seca y se evapora,
30 y el residuo se tritura con acetato de etilo. Tras filtra

1 ción y lavado con éter se obtienen 0,46 g (72%) de Boc-OGli-
-Arg(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Ile-OH. $R_f^3 = 0,23$; $R_f^4 = 0,40$.

Etapa 3

Eliminación de los grupos protectores

5 Se disuelven 0,46 g (0,35 mmoles) de Boc-Arg
(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Ile-OH en 2 ml de fluoruro de hi-
drógeno líquido, y se añaden 0,5 ml de tioanisol. La solu-
ción se mantiene a 0°C durante una hora, se precipita el
péptido con éter, se separa por filtración y se lava con
10 éter. Se obtienen 0,35 g (100%) del producto. La sal
fluoruro de hidrógeno obtenida se purifica como se ha des-
crito antes. Las características del análogo de (amino-
oxiacetil¹,Ile⁸)-angiotensina II son como sigue:

$$R_f^5 = 0,25; R_f^6 = 0,56; R_f^7 = 0,57; E_{Glu} = 1,00.$$

15 Análisis de aminoácidos: Pro: 1,02/1/; Val: 1,0/1/; Ile.
1,98/2/; Tir: 0,65/1/= His: 1,0/1/; Arg: 1b03/1/.

Ejemplo 2

(L- α -aminooxipropionil¹,Ile⁸)-angiotensina II

Etapa 1

20 Boc-OAla-Arg(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Ile-OH
Se disuelven 0,6 g (0,5 mmoles) de Boc-Arg(Tos)-
-Val-Tir-Ile-His-Pro-Ile-OH (preparado en la etapa 2 del
Ejemplo 1) en 5 ml de una solución 8 M de ácido clorhídri-
co en dioxano. La solución se deja reposar durante 20 minu-
25 tos, tras lo cual el heptapéptido libre ($R_f^4 = 0,1$) se pre-
cipita con éter seco, se filtra y se lava con éter. Se di-
suelve inmediatamente en 20 ml de dimetilformamida, el va-
lor del pH se ajusta a 8 con trietilamina, y se añaden 0,7
30 g (1,9 mmoles) de Boc-OAla-OPFF. Tras 30 minutos se evapora

1 la solución, y el residuo se disuelve en 30 ml de una mezcla 3:1 de cloroformo y dimetilformamida. La solución se agita con una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, y subsiguientemente con agua. Tras secado y evaporación, el residuo se tritura con acetato de etilo, se filtra y se lava, dando 0,55 g (84%) del compuesto del título. $R_f^4 = 0,43$;
 5 $R_f^5 = 0,80$.

Etapa 2

Eliminación de los grupos protectores

Se disuelven 0,52 g (0,42 mmoles) de Boc-OAla-
 10 -Arg(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Ile-OH en 2 ml de fluoruro de hidrógeno líquido, y se añaden 0,55 ml de tioanisol. La solución se mantiene a 0°C durante una hora, se precipita con éter seco, se filtra y se lava con éter. Se obtienen 0,41 g de (OAla¹,Ile⁸)-angiotensina II. Tras purificar el
 15 producto como se ha descrito antes, se obtiene un producto que tiene las siguientes características: $R_f^5 = 0,32$;
 $R_f^6 = 0,58$; $R_f^7 = 0,59$; $E_{Glu} = 1,0$.
 Análisis de aminoácidos: Pro: 1,0/1/; Val: 1,1/1/; Ile: 2,02/2/; His: 0,9/1/; Tir: 0,95/1/; Arg: 1,05/1/.

Ejemplo 3

(Aminooxiacetil¹,Leu⁸)-angiotensina II

Etapa 1

Boc-Arg(Tos)-Val-Tir(Bcl)-Ile-His(Dnf)-Pro-Leu-
 -ONB

25 Se disuelven 4,2 g (12 mmoles) de Leu-ONB·HBr en 50 ml de cloroformo y 1,68 ml de trietilamina, y se añaden 3,81 g (10 mmoles) de Boc-Pro-OPFF. La solución se agita a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras lo cual se
 30 agita con una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, y

1 subsiguientemente con agua. El dipéptido protegido ($R_f^1 = 0,8$)
obtenido tras secado y evaporación se disuelve en 20 ml de
una solución 8 M de ácido clorhídrico en dioxano, y tras
10 minutos la solución se diluye con éter seco y se evapora.
El dipéptido libre ($R_f^4 = 0,56$) se disuelve en 50 ml de
5 cloroformo sin aislarlo, el valor del pH de la solución se
ajusta a 8 con trietilamina, y se añaden 8,8 g (15 mmoles)
de Boc-His(Dnf)-OPFF. Tras 30 minutos se añaden 1,65 ml de
N,N-dimetilaminoetilamina a la solución, que se deja reposar
durante 10 minutos. Luego se agita con una solución
10 acuosa de ácido cítrico al 10%, solución acuosa 1 N de ácido
clorhídrico, solución de hidrogenocarbonato sódico, y
finalmente con agua. El extracto se seca y se evapora, y
el tripéptido protegido ($R_f^1 = 0,65$) obtenido se disuelve
en 25 ml de una solución 8 M de ácido clorhídrico en dic-
15 xano, sin aislarlo. El tripéptido libre se precipita con
éter seco ($R_f^4 = 0,47$), se separa por filtración y se lava.
Se disuelve inmediatamente en una mezcla de 50 ml de cloro-
formo y 20 ml de dimetilformamida, el pH se ajusta a 8 con
trietilamina, y se añaden 6,0 g (15 mmoles) de Boc-Ile-OPFF.
20 Tras 30 minutos se reemplaza el disolvente por acetato de
etilo, y la solución se agita con una solución acuosa de
ácido cítrico al 10% y subsiguientemente con agua. Tras se-
cado y evaporación, el tetrapéptido protegido ($R_f^1 = 0,65$)
se aísla mediante una mezcla 7:3 de n-hexano y éter. Luego
25 se disuelve en 25 ml de una solución 8 M de ácido clorhí-
drico en dioxano, y tras 15 minutos el tetrapéptido libre
($R_f^4 = 0,65$) se precipita con éter seco, se filtra y se la-
va con éter. Luego se precipita con éter seco, se filtra y
30 se lava con éter. Se disuelve inmediatamente en 50 ml de

1 una mezcla 1:1 de cloroformo y dimetilformamida, el valor del pH se ajusta a 8 con trietilamina, y se añaden 6,0 g (11,5 mmoles) de Boc-Tir-OPFF. Tras 15 minutos el disolvente se reemplaza por acetato de etilo, se añaden 0,66 ml de N,N-dimetilaminoetilamina, y la solución se deja reposar

5 durante 15 minutos. Luego se agita con una solución acuosa de ácido cítrico al 10%, solución acuosa 1 N de ácido clorhídrico, y finalmente con agua. Tras secado y evaporación, el pentapéptido protegido ($R_f^2 = 0,8$) se aísla con éter. El producto obtenido ($R_f^4 = 0,8$) se disuelve en 20 ml de una

10 solución 8 M de ácido clorhídrico en dioxano, se precipita por adición de éter seco, se filtra y se lava con éter. Se disuelve inmediatamente en 50 ml de dimetilformamida, el pH se ajusta a 8 con trietilamina, y se añaden 3,85 g (10 mmoles) de Boc-Val-OPFF. Tras una hora el disolvente

15 se reemplaza por cloroformo, se agita de manera usual, y el hexapéptido protegido ($R_f^2 = 0,82$) se aísla mediante éter. Luego se disuelve en 20 ml de una solución 8 M de ácido clorhídrico en dioxano, y tras 15 minutos el hexapéptido libre ($R_f^3 = 0,55$) se aísla mediante éter seco. Se

20 disuelve inmediatamente en 40 ml de dimetilformamida, el pH se ajusta a 8 con trietilamina, y se añaden 6,0 g (10 mmoles) de Boc-Arg(Tos)-OPFF. Tras 30 minutos el disolvente se reemplaza por cloroformo, y la solución se agita con una solución acuosa 1 N de ácido clorhídrico, y subsiguientemente con agua. El extracto se seca y evapora, dando un

25 heptapéptido protegido ($R_f^2 = 0,62$) que se aísla mediante etanol. Rendimiento: 7,5 g. (50% en relación al Boc-Pro-OPFF de partida). Punto de fusión: 186 a 190°C.

30

1

Etapa 2

Boc-OGli-Arg(Tos)-Val-Tir(Bcl)-Ile-His-Pro-Leu-
-OH

5

10

15

20

25

30

Se disuelven 3,45 g (2,26 mmoles) de Boc-Arg(Tos)-
-Val-Tir(Bcl)-Ile-His(Dnf)-Pro-Leu-ONB en 10 ml de dimetil-
formamida, se añaden 6,6 ml de 2-mercaptoetanol, y el hep-
tapéptido parcialmente protegido se precipita con éter se-
co tras dos horas de reposo. El producto se purifica por
precipitación con metanol/éter. Se obtienen 2,9 g (93%) de
Boc-Arg(Tos)-Val-Tir(Bcl)-Ile-His-Pro-Leu-ONB. $R_f^2 = 0,12$;
 $R_f^3 = 0,26$. El producto se disuelve en 40 ml de una mezcla
5:1:1 de metanol, ácido acético y agua, se añade 1,0 g de
un catalizador de paladio al 10% sobre carbón vegetal, y
se burbujea hidrógeno por la mezcla durante 6 horas. El ca-
talizador se separa por filtración, y se evapora la solución.
El residuo se tritura con éter, dando 2,5 g (89%) del pro-
ducto. $R_f^5 = 0,75$; $R_f^4 = 0,20$. Se disuelven 1,1 g (1 mmol)
de Boc-Arg(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Leu-OH en 10 ml de una
solución 8 M de ácido clorhídrico en dioxano. Tras 30 minu-
tos se precipita el heptapéptido libre ($R_f^4 = 0,08$) con éter
seco, se separa por filtración y se lava con éter. Se di-
suelve inmediatamente en 10 ml de dimetilformamida, se ajus-
ta el pH de la solución a 8 con trietilamina, y se añaden
0,54 g (1,5 mmoles) de Boc-OGli-OPFF. Tras 30 minutos se
diluye la solución con 30 ml de cloroformo, y se agita con
agua. El extracto se seca y se evapora, y el residuo se
tritura con acetato de etilo, se filtra y se lava con ace-
tato de etilo, y se obtiene 1,05 g (86%) de Boc-OGli-Arg
(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Leu-OH. $R_f^3 = 0,23$; $R_f^4 = 0,40$.

1. Etapa 3

Eliminación de los grupos protectores

Se disuelven 0,9 g (0,73 mmoles) de Boc-OGli-
-Arg(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Leu-OH en 5 ml de fluoruro de
5 hidrógeno líquido, y se añaden 1,5 ml de tioanisol. La mez-
cla de reacción se mantiene a 0°C durante 1,5 horas, tras
lo cual se trata con éter seco, y el péptido precipitado
se lava con éter y se separa por filtración. Se obtienen
0,55 g (80%) de (OGli¹,Leu⁸)-angiotensina II, que se puri-
10 fica de la manera descrita antes. $R_f^5 = 0,33$; $R_f^6 = 0,60$;
 $R_f^7 = 0,55$; $E_{Glu} = 1,18$.

Análisis de aminoácidos: Pro: 1,0/1/; Val: 1,0/1/; Ile:
1,0/1/; Lau: 1,1/1/; His: 0,95/1/; Arg: 1,0/1/; Tir: 0,7/1/.

Ejemplo 415 (D- α -aminooxipropionil¹,Leu⁸)-angiotensina IIEtapa 1

Boc-D-OAla-Arg(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Leu-OH

Se disuelven 1,1 g (1 mmol) de Boc-Arg(Tos)-Val-
-Tir-Ile-His-Pro-Leu-OH en 10 ml de una solución 8 M de áci-
20 do clorhídrico en dioxano. Tras 30 minutos se precipita el
heptapéptido con éter seco, se filtra y se lava con éter.
Se disuelve inmediatamente en 10 ml de dimetilformamida, se
ajusta el pH a 8 con trietilamina, y se añaden a la solu-
ción 0,56 g (1,5 mmoles) de Boc-D-OAla-OPFF. Tras 30 minu-
25 tos se diluye la solución con cloroformo, y se agita con
agua. Tras secado y evaporación, el residuo se tritura con
acetato de etilo, se filtra y se lava con acetato de etilo.
Así se obtienen 0,95 g (77%) de Boc-D-OAla-Arg-(Tos)-Val-
-Tir-Ile-His-Pro-Leu-OH. $R_f^4 = 0,29$.

30

1

Etapa 2

Eliminación de los grupos protectores

5

Se disuelven 0,95 g (0,77 mmoles) de Boc-D-OAla-Arg(Tos)-Val-Tir-Ile-His-Pro-Leu-OH en 4 ml de fluoruro de hidrógeno líquido, y se añaden 1,2 ml de tioanisol. La solución se mantiene a 0°C, la sustancia se precipita con éter seco, se filtra y se lava con éter. De esta manera se obtienen 0,6 g (90%) de (D-OAla¹,Leu⁸)-angiotensina II, que se puede purificar de manera usual. $R_f^5 = 0,33$; $R_f^6 = 0,61$; $R_f^7 = 0,56$; $E_{Glu} = 1,10$.

10

Análisis de aminoácidos: Pro: 1,02/1/; Val: 1,0/1/; Leu: 1,02/1/; Ile: 1,03/1/; His: 1,01/1/; Arg: 0,92/1/; Tir: 0,8/1/.

15

20

25

30
16088

1

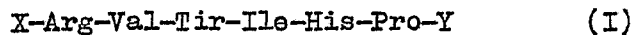
REIVINDICACIONES

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:

1ª.- Un procedimiento para preparar péptidos de fórmula general I:

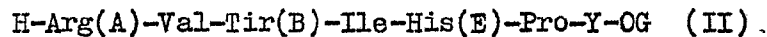
10



15

donde X es un radical derivado de un ácido α -aminocarboxílico alifático e Y representa un radical derivado de un ácido α -aminocarboxílico alifático, y sales de adición de ácido y complejos de los mismos, que comprende hacer reaccionar un derivado heptapéptido reactivo, de fórmula general II:

20



25

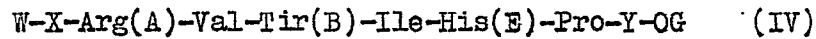
donde A representa un grupo adecuado para protección temporal del grupo guanidino de Arg, B representa un grupo adecuado para protección temporal del grupo hidroxilo aromático de Tir, E es un grupo adecuado para protección temporal del grupo imidazolo de His, G representa hidrógeno o un grupo adecuado para protección del grupo carboxilo del C terminal de aminoácido alifático, el cual grupo protector es estable bajo condiciones suavemente ácidas pero se puede escindir mediante ácidos o bases fuertes, e Y

30

1 tiene el mismo significado antes definido, con un deriva-
do reactivo de ácido aminocicarboxílico, de fórmula gene-
ral III:



5 donde X es como se ha definido antes, W es un grupo pro-
tector que se puede eliminar por acidolisis, y M represen-
ta un grupo hidroxilo o un grupo activador conocido por sí
mismo, y escindir los grupos protectores de los compuestos
10 de fórmula general IV:



15 obtenido, donde W, X, Y, A, B, E y G son como se han defi-
nido antes, selectivamente, uno tras otro o simultáneamen-
te, en una sola etapa de reacción, y, si se desea, conver-
tir un compuesto de fórmula general I obtenido en una sal
de adición de ácido o un complejo del mismo.

2ª.- "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR PEPTIDOS".

20 Tal y como se ha descrito en la Memoria que ante-
cede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veinticinco hojas escri-
tas a máquina por una sola cara.

Madrid, 25. AGO. 1978

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder.

25

30

CR. 16088