

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

18 ES	19	NUMERO	10 A1
	21	473.677	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		26-9-78	

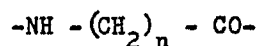
PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
78191	28 septiembre 1977	LUXEMBURGO
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C //A61K	
64 TITULO DE LA INVENCION		
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE CICLOPEPTIDOS		
71 SOLICITANTE (S)		
CIBA-GEIGY AG.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Klybeckstrasse 141, 4002 Basilea, Suiza.		
72 INVENTOR (ES)		
Hans Rink., Dr. Bruno Kamber., Peter Sieber.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
GOMEZ-ACEBO y POMBO.		



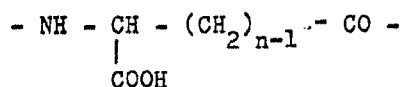
preferentemente en la posición p del anillo bencénico; especial preferencia tienen, además el resto L-fenilalanina insustituido, también el resto p-yodo-L-fenilalanina y p-hidroxi-L-fenilalanina. El grupo hidroxilo del último de los restos (es decir, del resto L-tirosina) se puede presentar también en forma eterada; para ellos son adecuados los alquilo inferiores, así como los distintos grupos hidroxilo protectores formadores de éter usuales en la química de los péptidos, por ejemplo, los mencionados más abajo; Especial preferencia tiene el grupo terc.-butilo, y el resto aminoácido<sup>11</sup> preferente se deriva de la p-terc.-butoxifenilalanina (es decir, tirosin-terc.-butiléter).

El resto de un ácido  $\omega$ -aminoalcano inferior-mono-carboxílico es preferentemente un resto de fórmula



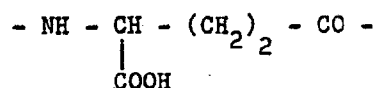
donde n significa un número entero de 1 hasta 7, especialmente 2 - 4. Tiene especial preferencia el resto del ácido  $\gamma$ -aminobutírico, que se designa con el símbolo "Gaba".

El resto de un ácido  $\omega$ -aminoalcano inferior-dicarboxílico se deriva preferentemente de un resto de fórmula



donde n tiene el significado de arriba y el grupo carboxilo se puede presentar también en una forma funcionalmente modificada, por ejemplo, como un éster ó amida, tal como un éster ó una amida insustituida usual en la química de los péptidos. Tiene especial preferencia un resto del ácido L- ó especialmente del ácido D-glutamí-

nico de fórmula

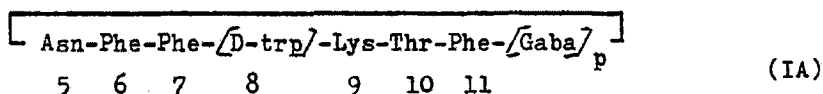


ó un resto correspondiente donde en lugar del grupo carboxilo se encuentra el grupo carbamilo.

5 En concordancia con el uso nomenclat6rico usual significa el prefijo "des" la falta de un s6mbolo as6 designado; as6 significa, por ejemplo, la expresi6n "des-X" que el s6mbolo X tiene el significado  $\overline{X}_m$ , donde  $m = 0$  y en la correspondiente f6rmula se ha de suprimir.

10 Los an6logos de somatostatina, seg6n la presente invenci6n, preferentes, son aquellos donde R significa preferentemente Asn ó des-R, el resto triptofano<sup>8</sup> tiene la configuraci6n D y -X-Y- juntos significan  $-\overline{\text{Gaba}}_p-$ , donde p es igual a 0, 1 ó 2. Como especialmente preferentes se han de destacar los compuestos

15 de f6rmula



donde p es 2 ó, especialmente p es 1. Todos 6stos an6logos de somatostatina preferentes se pueden presentar tambi6n en forma de sales de adici6n de 6cido ó complejos.

20 Como sales de adici6n de 6cido entran especialmente en consideraci6n las sales fisiol6gicamente compatibles con los 6cidos usuales terap6uticamente utilizables; de los 6cidos inorg6nicos son de mencionar los hidr6cidos halogenados, tales como el 6cido clorh6drico, pero tambi6n el 6cido sulf6rico ó bi6n el 6cido

25 fosf6rico ó bi6n pirofosf6rico, de los 6cidos org6nicos son en

primer lugar los ácidos sulfónicos, tales como el ácido benceno-  
ó p-tolueno-sulfónico, los ácidos alcano inferior-sulfónicos, tales  
como el ácido metanosulfónico, además también los ácidos carboxí-  
licos, tales como el ácido acético, ácido láctico, ácido palmítico,  
5 ácido esteárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido ascórbico  
y ácido cítrico.

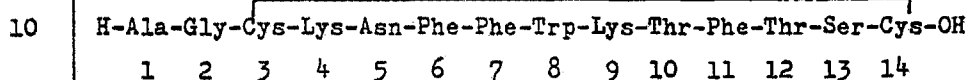
Bajo complejos se han de entender los compuestos  
no totalmente aclarados en su estructura que se forman al agregar  
ciertas sustancias inorgánicas ú orgánicas a los péptidos y le dan  
10 a éste un efecto más prolongado. Tales sustancias se describen, por  
ejemplo, para ACTH y otros péptidos de efecto adrenocorticotrópico.  
Son de mencionar, por ejemplo, los compuestos inorgánicos que se  
derivan de metales tales como calcio, magnesio, aluminio, cobalto  
y especialmente de cinc, ante todo las sales de difícil solubilidad,  
15 tales como fosfatos, pirofosfatos y polifosfatos, así como los  
hidróxidos de éstos metales; además los polifosfatos de metal al-  
calino, por ejemplo, "Calgon N", "Calgon 322", Calgon 188", ó  
"Polyron B 12". Compuestos orgánicos que producen una prolongación  
del efecto son, por ejemplo, las clases de gelatina antigena, por  
20 ejemplo, polioxigelatina, polivinilpirrolidona y celulosa carboxi-  
mética, además, el éster de ácido sulfónico ó de ácido fosfórico,  
de ácido alginico, dextrano, polifenoles y polialcoholes, ante todo  
fosfato polifloreético y ácido fitínico, así como los polímeros  
y copolímeros de aminoácidos básicos ó, ante todo ácidos, por ejem-  
25 plo, protamina ó ácido poliglutamínico.

Sí no se indica otra cosa la expresión "inferior",  
donde se presente en relación un resto ó compuesto orgánico, es  
siempre un resto ó compuesto con un máximo de 7, preferentemente  
sin embargo con un máximo de 4 átomos de carbono.

30 Los nuevos ciclopéptidos de la presente invención

muestran un efecto fisiológico que en caracter e intensidad es equivalente al efecto de la somatostatina. Por ésta razón se pueden emplear con ventaja en indicaciones terapéuticas similares como éste, por ejemplo, para el tratamiento de perturbaciones funcionales, donde la secreción de la hormona de crecimiento ó de la insulina y glucanol es superior a lo normal, tal como en la Acromegalia ó Diabetes juvenil.

La somatostatina, un tetradecapéptido cíclico de fórmula



[Science 179,77 (1973)] inhibe como es sabido la secreción regulada por la hipófisis de la hormona de crecimiento (Somatotropina). Además inhibe la actividad secretórica del páncreas endocrínico, tal como la secreción de insulina y glucagona.

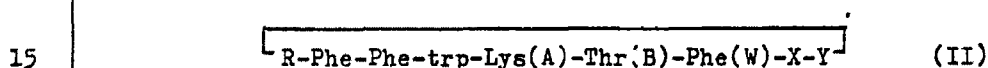
15 Estas valiosas propiedades no pueden llegar a una aplicación práctica total en la misma somatostatina, yá que su complicada estructura química impide una síntesis industrial de éste compuesto. Además del gran número de aminoácidos es también de especial desventaja la presencia de cistina; debido a su contenido en azufre éste aminoácido evita la aplicación de grupos protectores hidrogenolíticamente dissociables extraordinariamente ventajosos. Además una mitad (7 de 14) de los aminoácidos de la somatostatina lleva ulteriores grupos funcionales en la cadena lateral; éstos grupos exigen por una parte la protección pasajera especial, por otra parte elevan considerablemente el peligro de la racemización y complican por lo tanto aún más las condiciones de la síntesis.

25 Sorprendentemente se ha comprobado ahora que en la molécula de la somatostatina se pueden eliminar ó bien sustituir

varios de éstos aminoácidos sustituidos, especialmente también la cistina, por simples aminoácidos ópticamente inactivos, manteniéndose la actividad fisiológica.

5 La ventaja técnica para la síntesis de las sustancias somatostatín-activas se aprecian, ya claramente en que para la síntesis de la somatostatina se necesitan 13 aminoácidos ópticamente activos (7 de ellos con un ulterior grupo funcional protegido) como elementos de sintetización, mientras que en los compuestos de la presente invención son suficientes un máximo de 7 aminoácidos  
10 ópticamente activos (de ellos solo 2 con un ulterior grupo funcional protegido).

Los compuestos de la presente invención se pueden obtener según métodos en sí conocidos. En especial se obtienen si de un compuesto de fórmula



donde R, W, X, Y y trp tienen el significado arriba indicado, A significa un grupo protector  $\alpha$ -amino ó hidrógeno y B significa un grupo protector hidroxilo ó hidrógeno, donde solo uno de los símbolos A y B puede estar por hidrógeno, se disocia el ó los grupos  
20 protectores.

Como grupos protectores  $\alpha$ -amino se pueden emplear todos los grupos protectores amino usuales en la química de los péptidos, tal y como se describen en forma resumida en las obras correspondientes, por ejemplo, en Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie; 4. edición, tomo 15/I, E. Wünsch (Editor): Síntesis  
25 de péptidos, (Georg Thieme Verlag, Stuttgart; 1974). Tienen preferencia los grupos acidolíticamente disociables, tales como, en primer lugar el grupo terc.-butoxicarbonilo y grupos análogos, por

ejemplo, el grupo terc.-amiloxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, diisopropilmetoxicarbonilo, aliloxicarbonilo, ciclopentiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, d-isoborniloxicarbonilo y adamantiloxicarbonilo, así como también los grupos del tipo aralquilo, tales como benzhidrilo y trifenilmetilo (tritilo), ó determinados grupos aralcoxicarbonilo del tipo 2-(p-bifenilil)-2-propiloxicarbonilo, que se describen en la patente suiza 509 266.

Además se pueden emplear también grupos protectores amino reductiva ó básicamente disociables, por ejemplo, especialmente el grupo benciloxicarbonilo y los grupos benciloxicarbonilos que en la parte aromática están sustituidos por átomos de halógeno, grupos nitro, grupos alcoxi inferior y/ó restos alquilo inferior, tales como el grupo p-cloro- y p-bromobenciloxicarbonilo, p-bitrobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-toliloxicarbonilo, ó también el grupo isonicotiniloxicarbonilo, además también los grupos acilo, tales como p-toluenosulfonilo, bencenosulfenilo, o-nitrobencenosulfenilo ó bien también formilo, trifluoracetilo ó ftaloilo.

Un grupo protector  $\xi$ -amino especialmente ventajoso es un grupo etoxicarbonilo que en la posición  $\beta$ , lleva un grupo sililo sustituido por tres restos de hidrocarburo, tal como el grupo trifenilsililo, dimetilbutilsililo ó, ante todo, trimetilsililo. Un grupo  $\beta$ -(trihidrocarbilsilil)-etoxicarbonilo de éstos, tal como un grupo  $\beta$ -(trialquilo inferior-silil)-etoxicarbonilo, por ejemplo, especialmente el grupo  $\beta$ -(trimetilsilil)-etoxicarbonilo, forma con el grupo  $\xi$ -amino a proteger un grupo  $\beta$ -trihidrocarbilsili-etoxicarbonilamino correspondiente (por ejemplo, el grupo  $\beta$ -trimetilsililetoxicarbonilamino), que es estable a las condiciones de la hidrólisis ácida y a la hidrogenólisis, pero que se puede disociar bajo condiciones muy específicas, muy benignas por

la reacción de iones de fluoruro. En ésta relación se comporta análogo como el grupo  $\beta$ -silyletiléster descrito más abajo como grupo protector carboxilo. (Esta similitud se ha de tener especialmente en consideración en la síntesis: con excepto de casos individuales  
5 excluye el empleo de éste grupo protector el empleo simultaneo del otro grupo protector). Ulteriores detalles se indican más abajo en la protección del grupo carboxilo por  $\beta$ -silyletiléster.

Como grupo protector hidroxilo se pueden emplear todos los grupos usuales para ésta finalidad en la química de los  
10 péptidos, véase la obra arriba citada (Houben-Weyl). Tienen preferencia los grupos acidolíticamente dissociables, tales como 2-tetrahidropiraniolo y muy especialmente terc.-butilo, así como también terc.-butoxicarbonilo. Además también se pueden emplear grupos protectores hidroxilo reductiva ó básicamente dissociables, por ejemplo,  
15 los grupos bencilo y benciloxicarbonilo, que en la parte aromática pueden estar sustituidos por halógeno, nitro y/ó alcoxi inferior, ó bién los restos alcanoliolo inferior, tales como acetilo ó los restos aroilo, tal como benzoilo.

Preferentemente se seleccionan los grupos protectores A y B de manera que sean dissociables bajo condiciones similares; especialmente preferentes son aquí los grupos acidolíticamente dissociables yá destacados. La disociación de ambos grupos protectores se efectúa entonces ventajosamente en una sola operación; pero sin embargo también se pueden emplear grupos de distinta clase  
20 y disociar cada uno individualmente.

La disociación de los grupos protectores se realiza en forma en general conocida; la hidrólisis ácida (acidólisis) se efectua, por ejemplo, mediante ácido trifluoracético, ácido clorhídrico ó ácido fluorhídrico, en los grupos protectores sensibles  
30 a los ácidos también mediante un ácido carboxílico alifático inferior,

tal como ácido fórmico y/ó ácido acético, en presencia de agua y, en caso dado, de un alcohol polihalogenado ó alcanona inferior, tal como 1,1,1,3,3,3-hexafluorpropan-2-ol ó hexafluoracetona. Los grupos reductivamente disociables, especialmente aquellos que contienen  
5 restos bencilo, se retira preferentemente hidrogenolíticamente, por ejemplo, por hidrogenación bajo catálisis con paladio. El grupo isonicotiniloxicarbonilo se disocia preferentemente por reducción con cinc.

Los productos finales de la presente invención se obtienen, según la clase del aislamiento, como bases ó como sales  
10 de adición de ácido; éstas se pueden transformar ulteriormente entre sí en forma en sí conocida.

También la formación de los complejos arriba mencionados se realiza según métodos conocidos ó equivalentes a éstos.

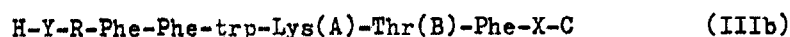
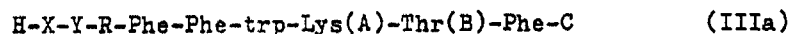
Los complejos con sustancias inorgánicas, tales como compuestos de metal de difícil solubilidad, por ejemplo, los compuestos de aluminio ó de cinc se obtienen preferentemente en  
15 forma análoga a como es conocido para el ACTH, por ejemplo, por reacción con una sal soluble del metal correspondiente, por ejemplo, cloruro de cinc ó sulfato de cinc y precipitación con un fosfato y/ó  
20 hidróxido de metal alcalino. Los complejos con compuestos orgánicos, tales como polioxigelatina, celulosa carboximetílica, polivinilpirrolidona, fosfato polifloretnico, ácido poliglutamínico, etc. se obtienen por mezcla de éstas sustancias con el péptido en solución acuosa. En igual forma se pueden obtener también los compues-  
25 tos insolubles con polifosfatos de metal alcalino.

Los compuestos de la fórmula II arriba caracterizados son nuevos y pertenecen también al objeto de la invención. Se obtienen ciclizando un péptido lineal correspondiente de fórmula

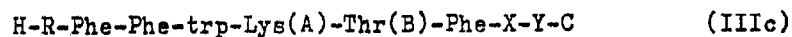


5 donde II' representa un resto correspondiente a la fórmula II donde está interrumpido el enlace amídico entre dos restos aminoácido adyacentes arbitrarios del anillo péptido y C significa un grupo hidroxilo libre, un grupo hidroxilo modificado por un grupo de activación ó el grupo hidrazino  $-\text{NH}-\text{NH}_2$ .

10 De entre los péptidos lineales de fórmula III, tienen preferencia aquellos donde como mínimo uno de los restos X e Y en el resto (II') forma un aminoácido en posición final. Estos productos de partida preferentes están caracterizados por las fórmulas



y especialmente



15 donde A, B, C, trp, R, X e Y tienen los significados arriba indicados. Tienen preferencia muy especial los compuestos de fórmula IIIa-c, donde A significa un grupo protector amino, ante todo un grupo protector amino acidolíticamente dissociable, B significa un grupo protector hidroxilo, ante todo un grupo protector hidroxilo acidolíticamente dissociable y C significa un grupo hidroxilo libre.

20 Un grupo funcional representado por el símbolo C completa el grupo carbonilo del resto aminoácido C-terminal y forma junto con el un grupo carboxilo libre, un grupo éster activado, ó bien un grupo carbazoilo.

El grupo de activación mediante el cual está mo-

dificado el grupo hidroxilo es especialmente uno de aquellos en el que el éster activado está formado por N-hidroxisuccinimida, 1-hidroxibenzotriazol, N,N'-díciclohexilisoúrea, 2,4,5-triclorofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol ó pentafluorfenol, pero también cualquier otro grupo de activación de ésta clase conocido en la química de los péptidos, véase Houben-Weyl, tomo 15/II.

La ciclización según la presente invención de los péptidos lineales de fórmula III se efectúa en forma en sí conocida mediante métodos de copulación usuales para el desarrollo del enlace amida, pudiéndose emplear sin embargo también los productos de partida péptídicos en una concentración muy reducida para desplazar el desarrollo de la copulación a favor de la ciclización intramolecular a costa de la policondensación intermolecular.

Los péptidos lineales se emplean ventajosamente en una concentración aproximadamente  $1.10^{-5}$ -molar hasta unos  $1.10^{-3}$ -molar, preferentemente en una concentración aproximadamente  $1.10^{-4}$ -molar, lo que corresponde a una concentración peso/volumen de aproximadamente 0,01 hasta 1,0 %, preferentemente un 0,1 %. En la mezcla de reacción se puede ajustar desde un principio una dilución correspondiente, ó también prepararla mediante lento gotado en forma continua del producto de partida y, en caso dado, de los demás reactantes en la mezcla de reacción.

Preferentemente se efectúa la ciclización sí en una concentración inicial arriba indicada a) un producto de partida de fórmula III, donde C significa un grupo hidroxilo libre y donde tanto el grupo  $\epsilon$ -amino del resto lisina como el grupo hidroxilo del resto treonina están protegidos, se trata con una carbodiimida, en caso dado en presencia de un componente formador de éster activo ó b) un producto de partida de fórmula III, donde C representa un grupo hidroxilo modificado en éster activado y el

grupo amino en posición final se encuentra en forma protonizada, donde como mínimo el grupo  $\xi$ -amino del resto lisina está protegido, se hace reaccionar con una base orgánica, ó c) un producto de partida de fórmula III, donde C significa el grupo  $-\text{NHNH}_2$  y como

5 mínimo el grupo  $\xi$ -amino del resto lisina está protegido, primeramente se trata bajo condiciones ácidas con ácido nitroso ó un éster de alquilo inferior del mismo y a continuación, en una concentración baja arriba mencionada, se cicliza con base orgánica en exceso.

La ciclización se efectua en disolventes adecuados; son de mencionar, por ejemplo, dioxano, tetrahidrofurano, acetonitrilo, piridina, dimetilformamida, dimetilacetamida, sulfóxido dimetílico, N-metilpirrolidona, hexametilfosforotriamida, así como también cloroformo y cloruro metilénico y las mezclas de los mismos.

10

En la variante de procedimiento a) se provoca la ciclización mediante una carbodiimida, preferentemente N,N'-diciclohexilcarbodiimida, que se emplea ventajosamente en exceso; es de suponer que aquí el producto de partida de fórmula III con el grupo carboxilo libre, se transforma primariamente en un éster activado de la dicitclohexilisourea (ó bién de una isourea análoga) y éster

15 activo formado in situ sigue reaccionando a continuación.

20

Una formación intermediaria del éster activo se debe sin duda a la adición del componente formador de éster activo como reactivo auxiliar; para ésta finalidad pueden servir los componentes formadores de éster activo usuales en la química de los

25 péptidos, tales como especialmente 2,4,5-triclorofenol, 2- ó 4-nitrofenol, pentacloro- y pentafluorfenol, pero, ante todo, los compuestos N-hidroxi, siendo de mencionar como especialmente ventajosos la N-hidroxisuccinimida, N-hidroxipiperidina y, ante todo, el l-hidroxibenzotriazol. La temperatura de trabajo en ésta variante

30 asciende por lo general a 0-70°, preferentemente 35-55°.

En la variante b) que trabaja con los ésteres activos terminados, especialmente con los ya destacados, se efectúa la ciclización en forma espontánea cuando el grupo amino en posición final es desprotonizado por la base orgánica. Las bases empleadas son, preferentemente, aminas cuaternarias ó, ante todo, terciarias, por ejemplo, trietilamina ó N-etilmorfolina. Preferentemente se trabaja a 10-30°, especialmente a temperatura ambiente.

En la variante c) se puede efectuar la primera fase, es decir, la formación del azida de ácido, por tratamiento con ácido nitroso ó un éster del mismo, ventajosamente con una concentración considerablemente superior de los productos de partida que en la ciclización a continuación. Convenientemente se trabaja con aproximadamente un equivalente de un nitrito de alquilo inferior, tal como etil-, isoamil- y especialmente terc.-butil-nitrito, en medio ácido clorhídrico a temperaturas desde unos -30° hasta unos -5°, preferentemente unos -20°; es permisible un pequeño exceso de nitrito. Después se pone básica la solución del azida formado, después de la necesaria dilución a una temperatura de unos 0° hasta unos 35° mediante una base orgánica en exceso, por ejemplo, una de las arriba mencionadas, y de ésta manera se hace ciclizar espontáneamente como en la variante b).

Los péptidos lineales de fórmula III, así como los productos intermedios que sirven para su síntesis son nuevos y se pueden emplear ventajosamente también para la síntesis de otros análogos de somatostatina, por ejemplo, aquellos con secuencia aminoácido más larga. Estos pertenecen, así como también sus procedimientos de obtención, al objeto de la presente invención. Se obtienen según métodos en sí conocidos condensando entre sí los aminoácidos necesarios para su sintetización ó bien unidades de péptidos más pequeñas bajo formación de enlaces CONH en secuencia temporal arbitra-

ria, pudiendose proteger intermediariamente los grupos funcionales que no participan en la reacción.

5 En la preparación de éstos productos de partida, así como también todos los productos intermedios necesarios, entran en consideración como grupos protectores para los grupos  $\alpha$ -amino y carboxilo en posición final, especialmente los grupos protectores usuales en la síntesis de péptidos de cadena larga, que se pueden disociar fácil y selectivamente por solvólisis ó reducción.

10 Como grupos protectores  $\alpha$ -amino se pueden mencionar, por ejemplo: Los grupos di- ó triaril-alquilo inferior en caso dado sustituidos, por ejemplo, por halógeno, nitro, alquilo inferior ó alcoxi inferior, tales como los grupos difenilmetilo ó trifenilmetilo, por ejemplo, benzhidrilo, tritilo, di-(p-metoxi)-benzhidrilo ó, ante todo, los grupos hidrogenolíticamente disocia-

15 bles que se derivan del ácido carbónico, tales como los grupos benziloxycarbonilo, en caso dado sustituidos en el resto aromático por átomos de halógeno, grupos nitro, grupos alquilo inferior ó alcoxi inferior, por ejemplo, benciloxycarbonilo, (es decir, carbobenzoxi), p-bromo- ó p-clorobenciloxycarbonilo, p-nitrobenciloxycarbonilo, p-metoxibenciloxycarbonilo; además, también 2-(p-bifenilil)-

20 2-propiloxycarbonilo y los grupos ariloxycarbonilo similares descritos en la patente suiza 509 266. Aquí se ha de observar que el grupo protector  $\alpha$ -amino ha de ser disociable selectivamente bajo mantenimiento del grupo protector  $\xi$ -amino en caso dado existente en el resto lisina. Por lo demás también es ventajoso si en su disociación se mantiene intacto un grupo protector carboxilo e hidroxilo en caso dado existente.

30 Los grupos carboxilo se protegen, por ejemplo, por formación de hidrazida ó por esterificación. Para la esterificación son adecuados, por ejemplo, los alcanoles inferiores, en caso dado

sustituido, tales como metanol, etanol, alcohol cianmetílico, 2,2,2-tricloroetanol, alcohol benzoilmetílico ó, especialmente, alcohol terc.-butílico, pero también un alcohol bencílico en caso dado sustituido. Una categoría especialmente ventajosa del los alcanoles sustituidos son los alcoholes etílicos que en la posición  $\beta$  llevan un grupo sililo trisustituido, tal como el grupo trifenilsililo, dimetilbutilsililo ó, ante todo, trimetilsililo. Como se describe, por ejemplo, en la patente belga Nr. 851.576 éstos alcoholes son especialmente bién adecuados para la protección de los grupos carboxilo yá que los correspondientes  $\beta$ -sililetésteres, por ejemplo,  $\beta$ -(trimetilsilil)-etiléster, si bién tienen la estabilidad de los ésteres alquílicos usuales, se pueden disociar selectivamente bajo condiciones benignas por la reacción de iones de fluoruro bajo mantenimiento de los demás grupos protectores.

Para la formación de ésteres activados, tales como, por ejemplo, en los compuestos de fórmula III, son adecuados, por ejemplo, los fenoles y tiofenoles en caso dado, sustituidos por sustituyentes atraedores de electrones, tales como fenol, tiofenol, tiocresol, p-nitrotiofenol, 2,4,5- y 2,4,6-triclorofenol, pentaclorofenol, o- y p-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, p-cianofenol, además, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxi-ftalimida y N-hidroxipiperidina.

El grupo hidroxilo del resto treonina se puede proteger por esterificación ó eterización, como yá se ha indicado más arriba, pero también se puede quedar libre.

Estos grupos protectores se pueden disociar en forma conocida. Así se puede disociar el grupo benciloxicarbonilo por hidrogenólisis, el grupo N-tritilo con ácidos minerales, tales como hidrácidos halogenados, por ejemplo, ácido fluorhídrico, preferentemente, ácido clorhídrico, ó un ácido orgánico, tal como ácido

fórmico, ácido acético, ácido cloroacético ó ácido trifluoracético, en trifluoretanol acuoso ó absoluto como disolvente (véase la publicación alemana DOS 2 346 147) ó con ácido acético acuoso, el grupo terc.-butiloxycarbonilo con ácido trifluoracético ó ácido clorhídrico, el grupo 2-(p-bifenilil)-isopropiloxycarbonilo con ácido acético acuoso ó, por ejemplo, con una mezcla de ácido acético glacial, ácido fórmico (al 82,8 %) y agua (7:1:2) ó según el procedimiento de la publicación alemana DOS 2 346 147.

Los grupos  $\beta$ -sililetiléster se disocian preferentemente con reactantes cededores de iones de fluoruro, por ejemplo, fluoruros de bases orgánicas cuaternarias, tales como fluoruro tetraetilamónico. Pero también se pueden disociar al igual que los restantes ésteres de alquilo, por hidrólisis alcalina, por ejemplo, mediante hidróxidos, carbonatos ó bicarbonatos de metal alcalino ó transformar por hidrazinólisis, por ejemplo, mediante hidrato de hidrazina, en los correspondientes grupos carbazolo.

Para la disociación de los ésteres de terc.-butilo se emplea preferentemente la acidólisis, para los ésteres de bencilo entonces la hidrogenólisis.

La condensación a realizar para la obtención de los péptidos lineales de fórmula III de las unidades de aminoácido y/ó de péptidos se efectúa en forma en sí conocida enlazando preferentemente un aminoácido ó un péptido con grupo  $\alpha$ -amino protegido y en caso dado grupo carboxilo terminal activado (=componente activo) con un aminoácido ó un péptido con grupo  $\alpha$ -amino libre y grupo carboxilo terminal libre ó protegido, por ejemplo, esterificado (= componente pasivo), en el producto formado se libera el grupo amino terminal y éste péptido, conteniendo un grupo  $\alpha$ -amino libre y un grupo carboxilo terminal, en caso dado, protegido se vuelve a hacer reaccionar con un ulterior componente activo, es decir,

un aminoácido ó un péptido con grupo carboxilo terminal activado y grupo  $\alpha$ -amino libre, etc. El grupo carboxilo se puede activar, por ejemplo, por transformación en un azida de ácido, anhídrido, imidazolido, isoxazolido de ácido ó en un éster activado, tal como uno de los arriba mencionados, ó por reacción con una carbodiimida, tal como N,N'-diciclohexilcarbodiimida, en caso dado bajo adición de N-hidroxisuccinimida ó un 1-hidroxibenzotriazol insustituido ó, sustituido, por ejemplo, por halógeno, metilo ó metoxi ó un 4-hidroxi-benzo-1,2,3-triazin-3-óxido (y otros, véase publicación alemana DOS 1 917 690, 1 937 656, 2 202 613) ó con N,N'-carbonildiimidazol. Como método de copulación más usual es de mencionar el método carbodiimida, además, también el método azida, el método de los ésteres activados y el método de anhídrido, así como el método de Merrifield y el método de los N-carboxianhidridos ó N-tiocarboxianhidridos.

En una obtención especialmente preferente de los péptidos lineales de fórmula II se emplea como método de copulación el método de carbodiimida con N,N'-diciclohexilcarbodiimida en presencia de 1-hidroxibenzotriazol. El grupo carboxilo terminal se protege aquí en forma de un éster de  $\beta$ -(trimetil-silil)-etilo, el grupo  $\alpha$ -amino del componente activo se protege por el grupo bencil-oxicarbonilo que después de cada etapa de copulación se disocia por hidrogenólisis. Para la protección del grupo  $\epsilon$ -amino del resto lisina se emplea la acilación con el grupo del terc.-butoxicarbonilo para el grupo hidroxilo del resto treonina la eterización con el grupo terc.-butilo. Estos dos grupos se pueden disociar, si se desea, finalmente en una etapa mediante hidrólisis ácida, por ejemplo, mediante ácido trifluoracético, ácido clorhídrico ó ácido fluorhídrico.

Según la forma de trabajo se obtienen los compuestos en forma de bases ó de sus sales. De las sales se pueden obtener

las bases en forma en sí conocida. De éstas últimas se pueden obtener a su vez, por reacción con ácidos, por ejemplo, con aquellos que forman las sales arriba mencionadas, las sales de adición de ácido terapéuticamente utilizables.

5                   Debido a la estrecha relación entre los nuevos compuestos en su forma libre y en forma de sus sales se entenderán en lo anterior y a continuación bajo los compuestos libres ó sus sales según sentido y finalidad, en caso dado también las sales correspondientes ó bién los compuestos libres.

10                   La invención se refiere también a aquellas formas de realización del procedimiento en las que se parte de un compuesto que se obtiene en cualquier etapa del procedimiento como producto intermedio y se realizan las etapas del procedimiento que faltan ó donde un producto de partida se forma bajo las condiciones  
15 de reacción ó se emplea en forma de un derivado del mismo, en caso dado de una sal.

                  En el procedimiento de la presente invención se emplean preferentemente aquellos productos de partida que conducen a los compuestos descritos al principio como especialmente venta-  
20 josos.

                  La presente invención se refiere asimismo a los preparados farmacéuticos que contienen los compuestos de fórmula I ó las sales farmacéuticamente utilizables de los mismos. Estos preparados farmacéuticos se pueden emplear especialmente en las indi-  
25 caciones arriba indicadas sí se administran por vía intraperitoneal, tal como intravenosa, intramuscular ó subcutáneamente, ó también intranasal. Las dosis necesarias dependen de las enfermedades especiales a tratar, de su gravedad y de la duración de la terapia. El número y la cantidad de las dosis individuales, así como el es-  
30 quema de administración se puede determinar mejor a base de las com-

probaciones individuales de el paciente en cuestión. El método para la determinación de éstos factores es conocido al especialista. Por regla general se encuentra sin embargo en una inyección la cantidad eficazmente terapéutica de un compuesto de éstos en el margen de dosificación de aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 0,2 mg/kg de peso corporal. Se dá preferencia al margen de unos 0,0015 hasta unos 0,15 mg/kg de peso corporal y la administración se efectúa por infusión intravenosa ó inyección subcutánea. Por lo tanto contienen los preparados farmacéuticos para administración parenteral en dosis individual, en dependencia de la clase de aplicación, por dosis aproximadamente 0,08 hasta aproximadamente 15 mg de un compuesto de la presente invención. Además de la sustancia activa contienen éstas generalmente un agente tampón, por ejemplo, un tampón fosfato, que ha de mantener el pH entre aproximadamente 3,5 y 7, además cloruro sódico, manita ó sorbita para la graduación de la isotonia. Se pueden presentar en forma secada por congelación ó disuelta, pudiendo contener las soluciones ventajosamente un agente de conservación de efecto antibacterial, por ejemplo, un 0,2 - 0,3 % de 4-hidroxibenzoato de metilo ó de etilo. Si en tales preparados la sustancia activa se ha de presentar en forma de un complejo con duración de efecto prolongada, entonces éste se puede preparar directamente mediante adición de los componentes formadores de complejo a una solución inyectable, por ejemplo, se prepara según las medidas más arriba mencionadas. Como aditivos son adecuados, por ejemplo, un 0,1 - 1,0 % en peso de una sal de cinc(II) (por ejemplo, sulfato) junto con un 0,5 - 5,0 % en peso de protamina (por ejemplo, sulfato) referido al volumen total de la solución inyectable; éste preparado se presenta como solución del pH 3,5 hasta aproximadamente 6,5 ó como suspensión del pH 7,5 hasta 8,0.

30

Un preparado para la administración intranasal se

puede presentar como solución acuosa ó gelatina, como solución ó suspensión oleginosa, ó también como crema grasosa. Un preparado en forma de una solución acuosa se obtiene, por ejemplo, disolviendo la sustancia activa de fórmula I, ó una sal de adición de ácido terapéuticamente aplicable de la misma en una solución tampón acuosa del pH 7,2 y agregando una sustancia generadora de la isotonia. A la solución acuosa se le agrega convenientemente un adhesivo polímero, por ejemplo, polivinilpirrolidona y/ó un agente de conservación. La dosis individual asciende aproximadamente a 0,08 hasta aproximadamente 15 mg, preferentemente 0,25 hasta 10 mg, en la que están contenidos aproximadamente 0,05 cc de una solución ó bien 0,05 g de un gel.

Una forma de aplicación oleginosa para la administración intranasal se obtiene, por ejemplo, por suspensión de un péptido de fórmula I ó de una sal de adición de ácido terapéuticamente utilizable del mismo, en un aceite, en caso dado bajo adición de agentes esponjadores, tales como estearato de aluminio y/ó agentes tensioactivos, cuyo valor HLB ("hydrophilic-lipophilic-balance") se encuentran por debajo de 10, tales como monoésteres de ácido graso de alcoholes polivalentes, por ejemplo, monoestearato de glicerina, monolaurato de sorbitano, monoestearato de sorbitano ó monooleato de sorbitano. Un ungüento grasos se obtiene, por ejemplo, por suspensión de la sustancia activa según la presente invención en una base grasosa untuosa, en caso dado bajo adición de un agente tensioactivo del valor HLB inferior a 10. Un ungüento emulsionado se obtiene por frote de una solución acuosa de la sustancia activa peptídica en una base grasosa untuosa blanda, bajo adición de un agente tensioactivo cuyo valor HLB se encuentre por debajo de 10. Todas éstas formas de aplicación intranasales pueden contener también agentes de conservación. Las dosis individuales ascienden aproximada-

mente a 0,08 hasta aproximadamente 15 mg, preferentemente 0,25 hasta 10 mg, contenidos en aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 0,1 g de masa básica.

5 Para la administración intranasal son también adecuados los preparados de inhalación ó insuflación tales como las cápsulas de insuflación que contienen la sustancia activa en forma de un polvo a insuflar con el aire respirable ó aerosoles ó sprays que pueden repartir la sustancia activa farmacológica en forma de un polvo ó en forma de gotas de una solución ó suspensión.

10 Los preparados con propiedades repartidoras de polvo tienen además de la sustancia activa los agentes auxiliares usuales: Las cápsulas de insuflación contienen, por ejemplo, excipientes sólidos, tales como lactosa; los preparados de aerosol ó bién de spray contienen, por ejemplo, un gas propulsor líquido con un punto de ebullición

15 por debajo de la temperatura ambiente así como, si se desea, ulteriores excipientes tales como agentes tensioactivos líquidos ó sólidos no iónicos ó aniónicos y/ó diluyentes sólidos. Los preparados en los que la sustancia activa farmacológica se encuentra en solución contienen además de ésta un agente de propulsión adecuado, además, es necesario un disolvente adicional y/ó un estabilizador. En lugar del gas propulsor se puede emplear también

20 aire a presión que se puede generar mediante un dispositivo de compresión ó de destensión adecuado según necesidades.

25 La invención se refiere asimismo al empleo de los nuevos compuestos de fórmula I y de las sales de adición de ácido terapéuticamente utilizables del mismo como compuestos farmacológicamente activos, especialmente en las indicaciones usuales para la somatostatina, preferentemente en forma de preparados farmacéuticos. La dosis diaria que se administra a un ser de sangre caliente de unos 70 kg, asciende desde unos 0,1 hasta unos 120 mg.

30

En los ejemplos a continuación se ilustra la invención sin por ello limitarla. Las temperaturas se indican en grados centígrados; como abreviaciones que se emplean por ejemplo, para la denominación de los aminoácidos, péptidos, grupos protectores, etc. se utilizan las abreviaciones resumidas en "Synthese von Peptiden" (Editor: E. Wunsch), tomo XV de "Methoden der org. Chemie" (Houben-Weyl) (1974; G. Thitme, Stuttgart). En especial se emplean las siguientes abreviaciones.

- 5
- 10 Boc - terc.-butoxicarbonilo  
 Bpoc - 2-(p-bifenilil)-2-propiloxicarbonilo  
 But - terc.-butilo (como grupo formador de éter)  
 DCCI - N,N'-díciclohexilcarbodiimida  
 Gaba - resto de ácido 4-aminobutírico,  $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-$   
 15 OBzl - benciloxi (como grupo formador de éster)  
 ONP - p-nitrofenoxi (como grupo formador de éster)  
 ONSu - succinimido-N-oxi  
 OTmse- 2-(trimetilsilil)-etoxi (como grupo formador de éster)  
 SEOC - 2-(trimetilsilil)-etoxicarbonilo  
 20 Z - benciloxicarbonilo (carbобензокси)  
 DC - cromatografía de capa delgada

En la DC se emplea, si no se indica otra cosa, gel de sílice como adsorbente y los siguientes sistemas como eluyentes:

- Sistema 45 : sec.-butanol-a amoniaco acuoso al 3 % (7:3)  
 25 Sistema 52 : n-butanol-ácido acético-agua (71,5:7,5:21)  
 Sistema 101 : n-butanol-piridina-ácido acético-agua (38:24:8:30)  
 Sistema 101 B : n-butanol-piridina-a amoniaco acuoso al 25 %-agua  
 (40:24:6:30)  
 Sistema 112 A : n-butanol-piridina-ácido fórmico-agua (42:24:4:20)  
 30 Sistema 157 : cloroformo-metanol-ácido acético-agua (70:42:0,5:10)

Sistema 157 A : cloroformo-metanol-ácido acético-agua  
(90:10:0,5:1)

Sistema 157 B : cloroformo-metanol-ácido acético-agua  
(85:13:0,5:1,5)

5 Sistema 157 C : cloroformo-metanol-ácido acético-agua  
(75:26:0,5:5)

Ejemplo 1

10

Asn - Phe - Phe - (D-trp) - Lys - Thr - Phe - Gaba

195 mg de octapéptido protegido de fórmula

15

Asn - Phe - Phe - (D-trp) - Lys(Boc) - Thr(But) - Phe - Gaba

20

se disuelve a 5° bajo N<sub>2</sub> en 1,5 cc de una mezcla de 89 volumen-% de ácido trifluoroacético, 10 vol.-% de agua y 1 vol.-% de ácido tioglicólico, la solución se calienta inmediatamente a 25° y después de 90 minutos se precipita a temperatura ambiente bajo N<sub>2</sub> con 15 cc de éter. El trifluoroacetato en bruto resultante del producto final se seca en vacío, se disuelve en 5 cc de ácido acético l-n y se filtra a través de 15 cc de AG<sup>®</sup> 1-X8 (Rio-Rad), forma acetato. El eluado se evapora en vacío y el residuo se somete a la

25 distribución en contracorriente del sistema n-butanol-ácido acético-agua (2400:600:3000) a través de 200 escalones. Las fases contenidas en los elementos 168 hasta 183 (K = 5.9) se recogen, se evapora en vacío y se liofiliza en terc.-butanol-agua (1:1).

30

El compuesto del título obtenido es unitario en la cromatografía de capa delgada en tres sistemas.

DC (celulosa, Merck): Sistema 101 : R<sub>f</sub> 0,9

111 B : R<sub>f</sub> 0,9

112 A : R<sub>f</sub> 0,8

El producto de partida peptídico se obtiene de la siguiente manera:

5

Etapa 1.1

Hidrocloruro de H-Phe-OTmse

10

Una solución de 2,50 g de Z-Phe-OTmse en 25 cc de metanol se hidrogena después de agregar 0,25 g de paladio-carbón (al 10 %) a temperatura ambiente y presión normal durante 3 horas manteniéndose el pH de la mezcla de reacción en 5,5 mediante adición de solución metanólica 1-n de ácido clorhídrico. Para la elaboración se separa el catalizador por filtración y el filtrado se evapora en vacío. El producto en bruto se puede emplear sin ulterior purificación para la siguiente etapa.

15

Etapa 1.2

20

Z-Thr(But)-Phe-OTmse

Una solución de 10,30 g de Z-Thr(But)OH en 120 cc de tetrahidrofurano anhidro y 4,20 cc de N-etilmorfolina se agrega durante 3 minutos a -15° a una solución de 4,43 cc de cloroformiato de isobutilo en 20 cc de tetrahidrofurano. Después de 10 minutos a -10° hasta -15° se agrega a -15° una solución de 10,05 g de hidrocloruro de H-Phe-OTmse (véase etapa 1.1) en 40 cc de tetrahidrofurano y otra porción de 4,20 cc de N-etilmorfolina y la mezcla de reacción se mantiene en cada caso durante 1 hora a -15°, a 0° y a

30

temperatura ambiente. Para la elaboración se separa por filtración el hidrocloruro de N-etilmorfolina precipitada, el filtrado se evapora en vacío, el residuo se disuelve en acetato de etilo y se lava cada vez tres veces con ácido cítrico l-n, hidrogenocarbonato sódico l-n y agua. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico, se evapora en vacío y en alto vacío se libera de las últimas huellas del disolvente. El producto se obtiene como aceite amarillento, viscoso, que es unitario según la DC.

DC: (cloroformo-metanol (9:1))  $R_f$  0,83

10 (acetato de etilo-éter de petróleo (7:3))  $R_f$  0,77

### Etapa 1.3

#### H-Thr(But)-Phe-OTmse

15

Una solución de 8,84 g de Z-Thr(But)-Phe-OTmse (etapa 1.2) en 325 cc de metanol se hidrogena después de agregar 880 mg de paladio-carbón (10 %), durante 5 horas a presión normal y temperatura ambiente. Para la elaboración se separa el catalizador por filtración y el filtrado se evapora en vacío. El residuo oleaginoso del producto es unitario según la DC y se emplea sin ulterior purificación en la etapa 1.4.

20

DC: (cloroformo-metanol (9:1))  $R_f$  0,62.

25

### Etapa 1.3A

#### Z-(D-trp)-Lys(Boc)-OH

A una solución de 33,84 g de Z-(D-trp)-OH y 17,42 g de 8-hidroxi-quinolina en 50 cc de acetonitrilo se gotea a 0° - 5°

30

una solución de 21.87 g de DCCI en 100 cc de acetonitrilo en el transcurso de 45 minutos. Después de otros 30 minutos a 5° se retira la dicitclohexilúrea precipitada por filtración y lavado con 50 cc de acetonitrilo. El filtrado se mezcla con una solución de 27,09 g de H-Lys(Boc)-OH en 25,9 cc de lejía potásica 4,25-n y 80 cc de acetonitrilo y se deja reposar durante 15 horas a temperatura ambiente. Para la elaboración se evapora la mezcla de reacción en vacío, el residuo se recoge en 1 litro de acetato de etilo, se lava tres veces, cada una con 200 cc de ácido clorhídrico 1-n a 0° y 3 veces, cada una con 200 cc de agua, la fase orgánica se seca sobre sulfato sódico y se evapora en vacío. El aceite marrón obtenido se disuelve en 150 cc de cloroformo y bajo fuerte agitación se gotea en 1,5 litros de hexano. El precipitado en forma de copos, pegajoso, se separa por filtración, se lava con 500 cc de hexano y se seca en vacío. Para la ulterior purificación se disuelve el material en 150 cc de tetraclorocarbono-acetato de etilo (6:4 partes en volumen) y se cromatografía en una columna de gel de sílice con ésta mezcla de disolventes. Las fracciones unitarias según el cromatograma de capa delgada adecuadas se evaporan en vacío con lo que se obtiene el producto puro en forma de una masa espumosa.

DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,61

#### Etapa 1.4

25 Z-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse

Una solución de 7,24 g de H-Thr(But)-Phe-OTmse en bruto (al 87 % según titración) (etapa 1.3) y 8,45 g de Z-(D-trp)-Lys(Boc)-OH (etapa 1.3A) en 100 cc de dimetilformamida se mezcla a 30 5° con 2,28 g de N-hidroxi-benzotriazol y 3,38 g de DCCI y la mezcla

de reacción se mantiene durante 1 hora a 5° y durante otras 5 horas a temperatura ambiente. Para la elaboración se separa por filtración la díciclohexilúrea precipitada y el filtrado se evapora en alto vacío. El residuo se recrystaliza dos veces en acetato de etilo-éter de petróleo y se seca en vacío, P.f. 114 - 120°.

DC: (cloroformo-acetato de etilo (1:1))  $R_f$  0,23;

(tolueno-acetona (1:1))  $R_f$  0,70

#### Etapa 1.5

#### H-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse

Una solución de 5,00 g de Z-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse (etapa 1.4) en 300 cc de metanol se hidrogena, después de agregar 0,50 g de paladio-carbón (10 %) a temperatura ambiente y a presión normal durante 5 horas. Para la elaboración se separa por filtración del catalizador y después de evaporar el filtrado se hace reaccionar el residuo que queda inmediatamente en la etapa 1.6.

#### Etapa 1.5 A

#### Z-Asn-Phe-Phe-OH

A una suspensión de 2,95 g de H-Phe-Phe-OH en 30 cc de dimetilformamida y 6 cc de agua se agregan 2,36 cc de lejía sódica 4-n y después 5,29 g de Z-Asn-ONP y se agita bien durante 20 horas a 35°. Para la elaboración se mezcla la solución reacción a 5° con 2,36 cc de ácido clorhídrico 4-n y la solución ligeramente turbia se filtra y el filtrado se concentra en alto vacío a unos 15 cc. Mediante adición de 150 cc de agua se precipita el producto

en bruto en forma gelatinosa, se separa por filtración y se seca en vacío sobre pentóxido de fósforo. Este material se disuelve y precipita aún dos veces, cada una de 20 cc de metanol y 50 cc de éter, se separa por filtración y se seca en vacío. Según el ensayo de racemización (hidrólisis total, derivatización de los aminoácidos y separación por cromatografía de gas) se encuentran en éste producto menos de un 2 % de los aminoácidos en la configuración D.  
DC: (cloroformo-metanol-ácido acético-agua (70:40:0,5:10))  $R_f$  0,50.

10 Etapa 1.6

Z-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse

Una solución de 632 mg de Z-Asn-Phe-Phe-OH (etapa 1.5 A) y 862 mg de H-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse (etapa 1.5) en 5 cc de dimetilformamida se mezcla con 210 mg de N-hidroxibenzotriazol y 276 mg de DCCI y se deja durante 15 horas a temperatura ambiente. Para la elaboración se separa la dicitclohexilúrea por filtración y el filtrado se evapora en alto vacío. El residuo oleaginoso se frota con 5 cc de metanol y se separa por succión. El material sin disolver se vuelve a frotar para su purificación nuevamente con 5 cc de metanol a 50°, se separa por succión, se lava con metanol y se seca en vacío. El producto es unitario según la DC.

25 DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,85  
(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,90.



DC: (cloroformo-metanol-amoniaco acuoso al 17 %-agua (50:40:6:4))

R<sub>f</sub> 0,39

Etapa 1.8

5

Z-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OBzl

Una mezcla de 430 mg de Z-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH (etapa 1.7) y 82 mg de Gaba-benciléster (liberado por adición de 0,046 cc de N-metilmorfolina a 152 mg del correspondiente p-toluenosulfonato, véase etapa 1.7 A) en 2 cc de dimetilformamida se mezcla con 61 mg de N-hidroxibenzotriazol y 93 mg de DCCI y se deja durante 20 horas a temperatura ambiente. Para la elaboración se mezcla la mezcla con 10 cc de metanol enfriado con hielo y se separa por filtración. El sólido obtenido se agita para la ulterior purificación con 5 cc de metanol caliente durante 10 minutos, la suspensión se enfría a 0°, el producto puro se separa por filtración y se seca en vacío.

10

15

DC: (cloroformo-metanol (85:15)) R<sub>f</sub> 0,85

20

Etapa 1.9

H-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OH

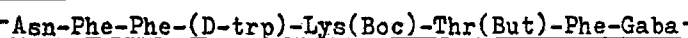
25

Una solución de 380 mg de Z-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OBzl (etapa 1.8) en 25 cc de dimetilformamida se hidrogena, después de agregar 50 mg de paladio-carbón (10 %) durante 6 horas a temperatura ambiente y presión normal. Para la elaboración se concentra la solución, después de separa el catalizador por filtración, en alto vacío a 2 cc y el producto se preci-

30

pita con 25 cc de éter libre de peróxido, se separa por filtración y se seca en vacío. El producto en bruto se somete sin ulterior purificación a la siguiente etapa 1.10 (ciclización).

5 Etapa 1.10



Una solución de 297 mg de H-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-  
 10 Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OH (etapa 1.9), 324 mg de N-hidroxibenzotriazol y 495 mg de DCCI en 240 cc de dimetilformamida se mantiene durante 20 horas a 50°. Para la elaboración se evapora el disolvente en alto vacío a unos 30° y el residuo se frota con 10 cc de acetato de etilo. La dicitclohexilúrea precipitada se elimina por filtra-  
 15 ción, el filtrado se diluye con acetato de etilo a 50 cc, se lava tres veces cada una con 20 cc de ácido oxálico acuoso 1-n y después con agua hasta estar neutro, se seca sobre sulfato sódico y se evapora en vacío. El producto en bruto se somete para su purificación a la distribución en contracorriente en el sistema metanol-agua-  
 20 cloroformo-tetraclorocarbono 2700:675:900:1575 partes en volumen) a través de 460 escalones. Las fases contenidas en los elementos 198 hasta 240 (K = 0,88) se reúnen y se evapora en vacío. El residuo se disuelve en 20 cc de terc.-butanol y se liofiliza resultando el material de la fórmula de arriba unitario según el cromatograma  
 25 de capa delgada.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,18

(cloroformo-metanol-agua (4:6:1))  $R_f$  0,77

Ejemplo 2

Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys-Thr-Phe-Gaba-Gaba

5 En forma análoga a como descrito en el ejemplo 1 se trata el nonapéptido protegido de fórmula

Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-Gaba

con ácido trifluoracético y se elabora.

10 Por la repartición en contracorriente ( $K = 5,45$ ) en 200 elementos se obtiene el producto deseado como sustancia amorfa unitaria según el cromatograma de capa delgada.

DC: celulosa, Merck;

Sistema 101 :  $R_f$  0,90

111B:  $R_f$  0,75

15 112A:  $R_f$  0,93

El nonapéptido protegido empleado como producto de partida se obtiene de la manera siguiente:

Etapa 2.1

20

Boc-Gaba-OH

25 Una solución previa de 41,25 g de H-Gaba-OH en 320 cc de dioxano-agua (1:1 partes en volumen) se ajusta con 20,5 cc de lejía sódica 4-n a un pH de 10,0 y se mezcla con 63,0 g de Boc-azida.

Mediante adición lenta de lejía sódica 4-n (en total 185 cc) durante 24 horas a temperatura ambiente se mantiene el pH

en 10,0. Para la elaboración se lava la solución de reacción tres veces, cada una con 250 cc de éter y la fase acuosa se ajusta a 5° a un pH de 3,0 mediante adición de 192 g de ácido cítrico. El material precipitado se recoge en 3 porciones de 400 cc de éter y las fases orgánicas reunidas se lavan neutro, se seca sobre sulfato sódico y se evapora en vacío. El residuo se disuelve en 50 cc de éter y se cristaliza mediante adición de 100 cc de éter de petróleo. P.f. 60 - 62°.

DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,83

(benceno-acetona (7:3))  $R_f$  0,21

#### Etapa 2.2

##### Boc-Gaba-Gaba-OBzl

Una solución de 2,03 g de Boc-Gaba-OH (etapa 2.1) en 20 cc de tetrahidrofurano anhidro se mezcla a -15°, primeramente con 1,39 cc de trietilamina y después durante 1 minuto con 1,31 cc de cloroformiato de isobutilo. Después de 10 minutos a -10° hasta -15° se agrega a -15° una solución de 3,65 g de H-Gaba-OBzl-p-toluenosulfonato (ejemplo 1.7 A) y 1,39 cc de trietilamina en 10 cc de dimetilformamida y la mezcla de reacción se mantiene en cada caso durante 1 hora a -10°, a 0° y a temperatura ambiente. Para la elaboración se mezcla la mezcla con 150 cc de acetato de etilo y se lava en cada caso tres veces con ácido cítrico 1-n,  $\text{NaHCO}_3$  1-n y con agua. La fase orgánica se evapora después de secar en vacío sobre sulfato sódico y el aceite residual, ligeramente teñido de amarillo, se libera en alto vacío de los restos del disolvente. El producto es unitario según la DC.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,60

(tolueno-acetona (7:3))  $R_f$  0,17

Etapa 2.3

5 Hidrocloruro de H-Gaba-Gaba-OBzl

2,00 g de Boc-Gaba-Gaba-OBzl (etapa 2.2) se disuelven en 15 cc de una solución 2-n de ácido clorhídrico en acetato de etilo y se deja durante 1 hora a temperatura ambiente. Después  
10 de enfriar la mezcla de reacción a 0° se separa el producto precipitado por filtración, se lava con 20 cc de éter y se seca en vacío, P.f. 80 - 83°.

DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,29

15 Etapa 2.4

Z-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-Gaba-OBzl

A una solución de 430 mg de Z-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-  
20 Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH (ejemplo 1.7) y 142 mg de hidrocloruro de H-Gaba-Gaba-OBzl (etapa 2.3) en 3 cc de dimetilformamida se agregan 45 mg de trietilamina, 61 mg de l-hidroxi-benzotriazol así como 93 mg de N,N'-diciclohexilcarbodiimida y se deja reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se mez-  
25 cla con 15 cc de agua y el material precipitado se separa por filtración y se seca en vacío sobre pentóxido de fósforo. Para la purificación se frota el producto en bruto con 5 cc de metanol caliente, se separa por succión y después de secar en vacío se precipita de una solución en 2 cc de dimetilformamida con 10 cc de me-  
30 tanol. El precipitado se separa por filtración, se lava con poco me-

tanol y se seca en vacío con  $\text{CaCl}_2$  que resulta un producto unitario según el cromatograma de capa delgada.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,80

5 Etapa 2.5

H-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-Gaba-OH

10 Este compuesto se obtiene en forma análoga al ejemplo 1.9 por hidrogenación de Z-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-Gaba-OBzl (etapa 2.4) y se sigue elaborando sin purificación en la etapa 2.6.

15 Etapa 2.6

Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-Gaba

20 Este compuesto se obtiene en forma análoga al ejemplo 1.10 por ciclización de H-Asn-Phe-Phe-(D-trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-Gaba-OH (etapa 2.5) mediante DCCI y 1-hidroxibenzotriazol. El producto en bruto se purifica por distribución en contracorriente (K = 1,1).

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,06

(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,69.

25

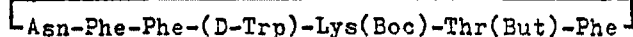
Ejemplo 3

Asn-Phe-(D-Trp)-Lys-Thr-Phe

30

En forma análoga, a como descrito en el ejemplo 1

se trata el péptido protegido de fórmula



con ácido trifluoracético y se sigue elaborando. Por distribución en contracorriente ( $K = 3,4$ ) a través de 220 escalones se obtiene el producto deseado como sustancia amorfa

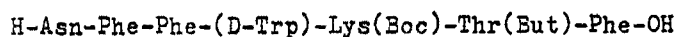
5 DC: Sistema 101  $R_f$  0,60

111 B  $R_f$  0,37

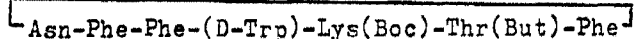
112 A  $R_f$  0,50

10 El péptido protegido empleado como producto de partida de la fórmula arriba indicada se obtiene como sigue:

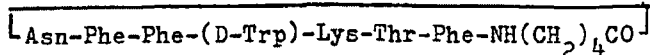
1,10 g de Z-Asn-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH (ejemplo 1.7) se hidrogenan en 30 cc de dimetilformamida bajo adición de 100 mg de Pd-carbón (10 %) hasta la disociación total del grupo Z (aproximadamente 4 horas, control por DC). Después de separar el catalizador por filtración se concentra el filtrado en alto vacío a 15 cc y la solución obtenida del péptido de fórmula



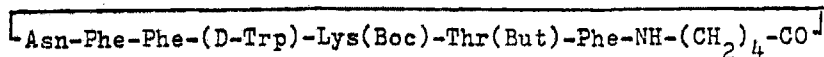
20 se cicliza en forma análoga a como descrito en el ejemplo 1.10 mediante DCCI y N-hidroxibenzotriazol. El producto en bruto se purifica por distribución en contracorriente ( $K = 0,71$ ), resultando el ciclo-péptido protegido deseado de fórmula



DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,83

Ejemplo 4

5 En forma análoga, a como descrito en el ejemplo 1 se trata el péptido protegido de fórmula



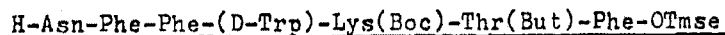
10 con ácido trifluoracético y se elabora. Por distribución en contracorriente ( $K = 3,31$ ) a través de 220 etapas se obtiene el producto como sustancia amorfa.

DC: Sistema 101  $R_f$  0,29

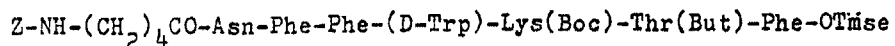
111B  $R_f$  0,34g

112A  $R_f$  0,47

15 El péptido protegido empleado como producto de partida se obtiene como sigue:

Etapa 4.1

20 942 mg de Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse (ejemplo 1.6) se hidrogenan en 50 cc de dimetilformamida bajo adición de 100 mg de Pd-carbón (10 %) hasta que se haya dissociado totalmente el grupo Z (aproximadamente 2 horas, control por DC). Después de separar el catalizador por filtración se concentra  
25 el filtrado en alto vacío a 4 cc y se emplea directamente en la etapa siguiente.

Etapa 4.2

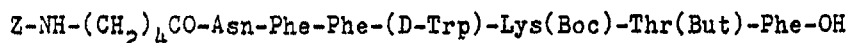
5 Una solución de 188 mg de ácido 5-benciloxicarbonylaminopentánico, 847 mg de heptapéptido en bruto de la etapa 4.1 anterior y 101 mg hidroxibenzotriazol en 4 cc de dimetilformamida se mezcla a 0 - 5° con una solución de 182 mg de DCCI con 1 cc de dimetilformamida. Después de 15 minutos a 0 - 5° se mantiene la  
 10 mezcla aún durante 18 horas a temperatura ambiente y después se separa por filtración de la diciclohexilúrea precipitada. El filtrado se concentra en alto vacío a 3 cc y el producto en bruto se precipita mediante adición de 60 cc de agua. Después de separar por filtración y secar se agita el precipitado para su purificación 2  
 15 veces, cada una con 20 cc de metanol a 40° y se separa por filtración.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,61

(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,89.

Etapa 4.3

20



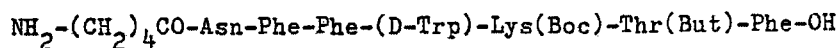
760 mg de Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse (etapa 4.2) se disuelven en 17,1 cc de una solución de fluoruro de tetraetilamonium 0,15-molar anhidro, recién preparada, en dimetilformamida y se mantiene durante 40 minutos  
 25 a temperatura ambiente. Después de enfriar a 0 - 5° se mezcla la mezcla de reacción bajo buena agitación con 0,51 cc de ácido clorhídrico acuoso 1-n y el producto se precipita mediante adición de

80 cc de agua.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,13

(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,65.

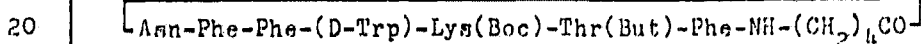
5 Etapa 4.4



10 696 mg de Z-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-  
 Thr(But)-Phe-OH (etapa 4.3) se hidrogenan en 70 cc de dimetilformami-  
 da bajo adición de 80 mg de Pd-carbón (10 %) hasta la disociación  
 total del grupo Z (unas 2 horas, control por DC). Después de separar  
 el catalizador por filtración se concentra el filtrado en vacío a  
 unos 3 cc y el producto se precipita con 50 cc de éter libre de  
 15 peróxido.

DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,46

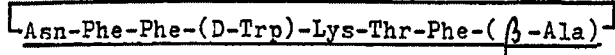
Etapa 4.5



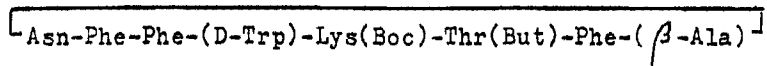
Por ciclización del octapéptido lineal de fórmula  
 NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CO-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH (etapa 4.4)  
 análogo al procedimiento descrito en el ejemplo 1.10 se obtiene me-  
 diante DCCI y N-hidroxibenzotriazol el péptido cíclico deseado. El  
 25 producto en bruto se purifica por distribución en contracorriente  
 (K = 0,66).

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,50

(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,77

Ejemplo 5

5 En forma análoga a como descrito en el ejemplo 1 se trata el péptido protegido de fórmula



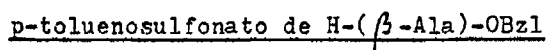
10 con ácido trifluoracético y se elabora. Por distribución en contracorriente ( $K = 5,0$ ) a través de 170 etapas se obtiene el producto deseado como sustancia amorfa.

DC: Sistema 101  $R_f$  0,53

111B  $R_f$  0,32

112A  $R_f$  0,39

15 El ciclopéptido protegido empleado como producto de partida se obtiene como sigue:

Etapa 5.1

20

En forma análoga a como descrito en el ejemplo 1.7A se obtiene por esterificación de  $\beta$ -alanina con alcohol bencílico en presencia de ácido p-toluenosulfónico el éster deseado como p-toluenosulfonato. P.f. 94,5 - 101°.

25 DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,38

Etapa 5.2Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-( $\beta$ -Ala)-OBzl

5 En forma análoga a como descrito en el ejemplo 1.8 se hacen reaccionar 1,09 g de Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH (ejemplo 1.7) con 0,33 g de p-toluenosulfonato de H-( $\beta$ -Ala)-OBzl mediante DCCI en presencia de N-metilmorfolina y N-hidroxibenzotriazol y se elabora.

10 DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,69  
(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,89

Etapa 5.315 H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-( $\beta$ -Ala)-OH

En forma análoga a como descrito en el ejemplo 1.9 se transforma el éster bencílico del H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-( $\beta$ -Ala)-OBzl (etapa 5.2) por hidrogenación en el ácido libre correspondiente.

20 DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,52

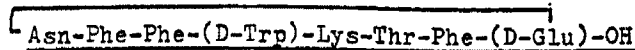
Etapa 5.425 Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-( $\beta$ -Ala)-OH

Análogo al procedimiento descrito en el ejemplo 1.10 se cicliza el ácido libre H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-( $\beta$ -Ala)-OH mediante DCCI y N-hidroxibenzotriazol. El producto en bruto se purifica por distribución en contracorriente ( $K = 0,71$ ).

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,65  
 (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,80

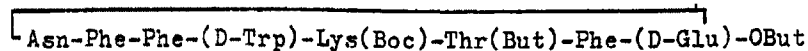
Ejemplo 6

5



En forma análoga a como descrito en el ejemplo 1,  
 se trata el péptido protegido de fórmula

10

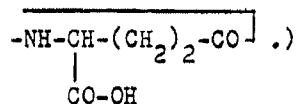


con ácido trifluoroacético y se elabora. Por distribución en contra-  
 corriente ( $K = 4,26$ ) a través de 300 etapas se obtiene el producto  
 deseado como sustancia amorfa.

15

DC: 101  $R_f$  0,53  
 111B  $R_f$  0,40  
 112A  $R_f$  0,31

(el símbolo  $\overline{\text{-Glu-OH}}$  representa el resto de fórmula



20

El péptido protegido empleado como producto de par-  
 tida se obtiene de la manera siguiente.

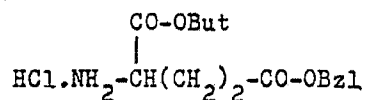
Etapas 6.1

Hidrocloruro de H- $\overline{\text{D}}$ -Glu(OBzl)-OBut

25

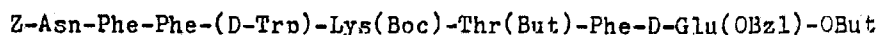
Una mezcla de 5,00 g de H- $\overline{\text{D}}$ -Glu(OBzl)-OH y 40 cc  
 de isobuteno líquido se agita con 4 cc de ácido sulfúrico concentrado

en 40 cc de dioxano en un recipiente cerrado a temperatura ambiente hasta que se forme una solución clara y se mantiene durante otras 4 horas a temperatura ambiente. Para la elaboración se vierte la mezcla de reacción enfriada a  $-20^{\circ}$  en una mezcla enfriada con hielo de 300 cc de éter y 203 cc de hidróxido sódico 1-n. La fase etérica se lava tres veces, cada una con 50 cc de agua. Después de la extracción ulterior de la fase acuosa con otros 300 cc de éter se secan las fases orgánicas reunidas sobre sulfato sódico, se concentra en vacío a 10 cc y a  $0^{\circ}$  se mezcla bajo buena agitación con 30 cc de solución de ácido clorhídrico 0.7-n en metanol. La solución obtenida se evapora en vacío, el residuo se frota con 20 cc de éter de petróleo hasta que se presente cristalización. El producto separado por filtración de fórmula



se purifica por cromatografía en una columna de gel de sílice (170 g) mediante cloroformo-metanol (85:15), P.f.  $107 - 108^{\circ}$  (descomposición),  $[\alpha]_D^{25} : -15^{\circ} \pm 1^{\circ}$  (etanol, 2 %).  
DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,60.

#### Etapa 6.2



Una solución de 1,09 g de Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH (ejemplo 1.7), 0,31 g de HCl. $\overline{D}$ -Glu(OBzl)-OBu (etapa 6.1), 0,13 g de N-hidroxibenzotriazol y 95 mg de N-metil-morfolina en 8 cc de dimetilformamida se mezcla a  $0 - 5^{\circ}$  con una solución de 0,21 g de DCCI en 2 cc de dimetilformamida y después de

30 minutos a 0 - 5° se mantiene aún durante 15 horas a temperatura ambiente. La diciclohexilúrea precipitada se separa por filtración y el filtrado se evapora en alto vacío. El residuo se frota con 30 cc de agua, se filtra, se seca y para su purificación se agita aún dos veces, cada una con 10 cc de metanol y se separa por filtración.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,85  
(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,91.

10 Etapa 6.3

H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe- $\overline{D}$ -Glu $\overline{7}$ -OBut

En forma análoga como descrito en el ejemplo 1.9 se hidrogena el compuesto de fórmula H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe- $\overline{D}$ -Glu(OBzl) $\overline{7}$ -OBut (etapa 6.2) al producto deseado.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,13  
(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,65

20 Etapa 6.4

Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe- $\overline{D}$ -Glu $\overline{7}$ -OBut

En forma análoga a como descrito en el ejemplo 1.10 se cicliza el ácido de fórmula H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe- $\overline{D}$ -Glu $\overline{7}$ -OBut mediante DCCI y N-hidroxibenzotriazol. El producto en bruto se purifica por distribución en contracorriente ( $K = 0,52$ ).

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,54  
(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,83.



Etapa 7.2Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH

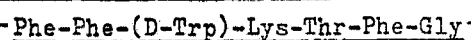
5 Una solución de 2,86 g de Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-  
Thr(But)-Phe-OH se en 13,5 cc de dimetilformamida se mezcla a 30° con  
6,1 cc de una solución de fluoruro de tetrabutilamonium 1,12-molar  
en sulfóxido dimetílico y se deja durante 5 minutos a ésta tempera-  
10 tura. El producto se precipita por goteado en ácido clorhídrico di-  
luido enfriado con hielo y se purifica por disolución y precipita-  
ción de solución de acetonitrilo con ácido clorhídrico diluido.  
DC: Sistema 157A R<sub>f</sub> 0,35

Etapa 7.3

15

Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-

Una solución de 870 mg de Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-  
20 Thr(But)-Phe-OH en 20 cc de dimetilformamida se hidrogena en pre-  
sencia de 90 mg de paladio-carbón (10 %) durante 2 horas a tempera-  
tura ambiente. Después de separar el catalizador por filtración se  
concentra el filtrado en alto vacío a pocos cc, se mezcla con 790 cc  
de dimetilformamida, 1,2 g de N-hidroxibenzotriazol y 1,6 g de DCCI  
y se deja durante 15 horas a 50°. Después de agregar 2 cc de solu-  
25 ción de ácido oxálico 5-molar en dimetilformamida, se concentra en  
alto vacío a unos 10 cc, la dicitclohexilúrea se separa por succión  
y el producto se precipita por goteado en solución diluida de hidro-  
genocarbonato sódico. Por cromatografía en gel de sílice se eluye  
el producto puro con cloroformo bajo adición de 3 - 5 % de metanol.  
30 DC: Sistema 157A R<sub>f</sub> 0,5.

Ejemplo 8

5

450 mg de  $\text{Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gly}$ 

se tratan como en el ejemplo 1 con ácido trifluoracético. El producto en bruto se transforma con un intercambiador de iones en el acetato y éste se purifica por distribución en contracorriente en el sistema n-butanol-ácido acético-agua-tolueno (4:1:5:4) a través de 420 etapas. La solución pura ( $K = 1,5$ ) se aísla en la forma usual. DC (gel de sílice, Merck) : Sistema 157C  $R_f$  0,25.

10

El producto de partida se obtiene como sigue:

Etapa 8,1

15



20

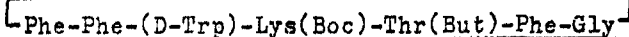
Una solución de 800 mg de Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH (ejemplo 7.2), 290 mg de p-toluenosulfonato de H-Gly-OBzl y 130 mg de N-hidroxibenzotriazol en 4 cc de dimetilformamida se mezcla a  $0^\circ$  con 0,095 cc de N-metilmorfolina y 200 mg de DCCI y se deja durante 16 horas a  $0^\circ$ . Después de separar la dicitclohexilúrea por filtración se precipita el producto por goteado en solución diluida de hidrogenocarbonato sódico. El producto en bruto se purifica por recristalización en metanol-agua (9:1) y acetonitrilo-agua (1:1).

25

DC: (cloroformo-metanol (95:5))  $R_f$  0,55

Sistema 157A

$R_f$  0,75

Etapa 8.2

5 Una solución de 780 mg de Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gly-OBzl (etapa 8.1) en 15 cc de dimetilformamida se hidrogena en presencia de 80 mg de paladio-carbón (10 %) durante 6 horas. Después de separar el catalizador por filtración se concentra fuertemente el filtrado, se mezcla con 115 cc de dimetilformamida,

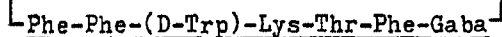
10 910 mg de N-hidroxibenzotriazol y 1,22 g de DCCI y se deja durante 20 horas a 50°. La elaboración se efectua como descrito en el ejemplo 7.3. Para la purificación del producto en bruto se realiza una distribución en contracorriente a través de 460 etapas en el mismo sistema como descrito en el ejemplo 1.10.

15 (K = 0,4)

DC: Sistema 157 A  $R_f$  0,4.

Ejemplo 9

20



260 mg de  $\boxed{\text{Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba}}$  se tratan análogo al ejemplo 1 con ácido trifluoracético. Mediante intercambiador de iones se transforma el producto en el acetato que se purifica por distribución en contracorriente a través de 300 etapas en el sistema sec.-butanol-agua-ácido acético (100:100:1). La sustancia pura (K = 1,5) se aísla en la forma usual.

25

DC: (gel de sílice, Merck): Sistema 157  $R_f$  0,5

El producto de partida se obtiene como sigue:

Etapa 9.1Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OBzl

5 Una solución de 420 mg de Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-  
Thr(But)-Phe-OH (ejemplo 7.2), 165 mg de p-toluenosulfonato de H-  
Gaba-OBzl y 70 mg de N-hidroxibenzotriazol en 2 cc de dimetilforma-  
mida se mezcla a 0° con 0,05 cc de N-metilforfolina y 100 mg de DCCI  
y se deja durante 20 horas a 0°. Después de separar la dicitohexil-  
10 úrea por filtración se precipita el producto por goteado en solu-  
ción de hidrogenocarbonato sódico.

DC: Sistema 157A: R<sub>f</sub> 0,65.

Etapa 9.2

15

Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-

Una solución de 500 mg de Z-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-  
Thr(But)-Phe-Gaba-OBzl en 20 cc de dimetilformamida se hidrogena en  
20 presencia de 50 mg de paladio-carbón (10 %) durante 2 horas. Des-  
pués de separar el catalizador por filtración se concentra fuerte-  
mente el filtrado en alto vacío, el residuo se mezcla con 370 cc  
de dimetilformamida, 560 mg de N-hidroxibenzotriazol y 760 mg de DCCI  
y se deja durante 18 horas a 50°. La elaboración y purificación del  
25 producto se efectua análogo al ejemplo 8.2, K = 0,3.

DC: Sistema 157A: R<sub>f</sub> 0,45.



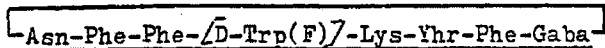
trado en alto vacío, el residuo se mezcla con 140 cc de dimetilformamida, 215 mg de N-hidroxibenzotriazol y 290 mg de DCCI y se deja durante 20 horas a 50°. La elaboración y purificación se efectúa como en el ejemplo 8.2.

5 K = 0,8.

DC: Sistema 157B: R<sub>f</sub> 0,45

### Ejemplo 11

10



340 mg de  $\boxed{\text{Asn-Phe-Phe-}\overline{\text{D}}\text{-Trp(F)}\text{-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba}}$  se tratan como descrito en el ejemplo 1 con ácido trifluoracético, mediante intercambiador de iones se transforma en el acetato por distribución en contracorriente en el sistema tampón

15 terc.-butanol-tolueno-metanol (acetato de amonio 0,05-molar + ácido acético 0,05-molar) (7:7:3:10) se purifica a través de 500 etapas (K = 0,14).

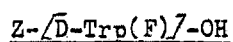
(El símbolo  $\overline{\text{D}}\text{-Trp(F)}$  significa 5-fluor-D-triptofano).

20 DC: Sistema 157: R<sub>f</sub> 0,36

El producto de partida se obtiene como sigue:

### Etapas 11.1

25



Una solución de 2 g de 5-fluor-DL-triptofano en 9 cc de lejía sódica 1-n se mezcla bajo enfriamiento con hielo y fuerte agitación simultáneamente con 1,4 cc de cloroformiato de bencilo y 10,5 cc de lejía sódica 1-n. Después de otras 2 horas se agre-

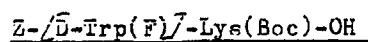
30

gan 50 cc de acetato de etilo, el pH de la mezcla bifásica se ajusta con ácido clorhídrico a 1, la fase orgánica se separa, se lava con agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora. El residuo se disuelve en 9,5 cc de agua y 5 cc de lejía sódica 2-n, después de  
 5 agregar 1,5 cc de anilina, 100 mg de hidrocloreuro de L-cisteina y 34cc de tampón de citrato 0,2-molar (pH 5) se precipita en parte el producto de partida; la suspensión se ajusta con ácido clorhídrico 2-n a un pH de 6,3. 260 mg de papaina se suspenden en 2 cc de agua de 40°, lo insoluble se separa por centrifugación, 1,9 cc de la solución sobrenadante se agrega a la suspensión de arriba y ésta se  
 10 agita durante 20 horas a 40°. Bajo enfriamiento con hielo se ajusta el pH de la mezcla con lejía sódica 2-n a 8, la Z-[L-Trp(F)]-anilida insoluble se separa por filtración, el filtrado se ajusta con ácido clorhídrico 5-n a un pH de 5,3 y como arriba se mezcla con hidrocloreuro de cisteina y papaina. Después de otras 20 horas se vuelve a separar por filtración la anilida formada y el filtrado se vuelve a tratar durante 3 días igual que arriba, con lo que solo se forman  
 15 huellas del anilida. El filtrado se recubre con acetato de etilo, se acidifica a un pH de 1 - 2; la capa orgánica se lava con agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora. El residuo se recristaliza en diisopropiléter-hexano.

DC: Sistema 157B:  $R_f$  0,3

Etapa 11.2

25



1.15 g de Z-[D-Trp(F)]-OH se transforma según el procedimiento descrito en el ejemplo 1.3A en el dipéptido mencionado  
 30 en el título. DC: Sistema 157B:  $R_f$  0,33

Etapa 11.3Z- $\overline{D}$ -Trp(F)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse

5 Una solución de 380 mg de Z-/D-Trp(F)-Lys(Boc)-OH, 300 mg de H-Thr(But)-Phe-OTmse (ejemplo 1.3) y 110 mg de N-hidroxi-benzotriazol en 2,5 cc de dimetilformamida se mezcla a 0° con 170 mg de DCCI. Después de 15 horas se elabora análogo al ejemplo 7.1 y el producto se purifica por recristalización en acetato de etilo-éter

10 de petróleo.

DC: Sistema 157A: R<sub>f</sub> 0,76

Etapa 11.415 Z-Asn-Phe-Phe- $\overline{D}$ -Trp(F)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse

Una solución de 490 mg de Z- $\overline{D}$ -Trp(F)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OTmse en 15 cc de metanol-agua (9:1) se hidrogena en presencia de 50 mg de paladio-carbón (10 %), manteniéndose continuamente mediante adición simultánea de ácido clorhídrico 0,2-n en el disolvente arriba mencionado un pH de 5. La mezcla de reacción se separa por filtración, el filtrado se concentra y se deshidrata

20 3 veces por evaporación con dimetilformamida. A la solución residual (1,2 g) se agregan 305 mg de Z-Asn-Phe-Phe-OH, 83 mg de N-hidroxi-benzotriazol, 0,06 cc de N-metilmorfolina y 1,2 cc de dimetilfor-

25 mamida. A -5° se agregan 130 mg de DCCI y se deja durante 16 horas a ésta temperatura. Después de la elaboración según el ejemplo 7.1 se recristaliza el producto en acetonitrilo-agua.

DC: Sistema 157A: R<sub>f</sub> 0,6

Etapa 11.5Z-Asn-Phe-Phe- $\overline{D}$ -Trp(F)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH

5 Una solución de 600 mg de Z-Asn-Phe-Phe- $\overline{D}$ -Trp(F)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH se mezcla a 30° con 3,8 cc de solución de fluoruro de tetraetilamonium 0,34-molar en sulfóxido dimetílico y se deja durante 30 minutos a 30°. La solución se gotea bajo enfriamiento con hielo en 50 cc de agua y  
10 0,65 cc de ácido clorhídrico 2-N y el precipitado se separa por filtración. El producto se purifica por recristalización en acetonitrilo-agua.

DC: Sistema 157A  $R_f$  0,35.

15 Etapa 11.6Z-Asn-Phe-Phe- $\overline{D}$ -Trp(F)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OBzl

20 Una solución de 470 mg de Z-Asn-Phe-Phe- $\overline{D}$ -Trp(F)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-OH, 165 mg de p-toluenosulfonato de H-Gaba-OBzl (ejemplo 1.7A) y 66 mg de N-hidroxibenzotriazol en 2 cc de dimetilformamida se mezcla a -5° con 0,05 cc de N-metilmorfolina y 100 mg de DCCI. Después de 16 horas a ésta temperatura se elabora  
25 análogo al ejemplo 7.1. El producto se obtiene puro con excepción de huellas de dicitclohexilúrea.

DC: Sistema 157A  $R_f$  0,55



(El símbolo  $\overline{D}$ -Trp(NO<sub>2</sub>) significa 6-nitro-D-triptofano).

El producto de partida se obtiene como sigue:

Etapa 12.1

5

Z-Gaba-OTmse

Una solución de 5,93 g de Z-Gaba-OH y 3,84 g de trimetilsili-etanol en 10 cc de acetonitrilo y 6 cc de piridina se enfría a 5° y bajo agitación se mezcla con 5,70 g de DCCI. Después de 1 hora a 5° se mantiene la mezcla de reacción aún durante 15 horas a temperatura ambiente. La dicitclohexilúrea precipitada se separa por filtración y se lava con acetato de etilo y el filtrado se evapora. El residuo se cromatografía en una columna de gel de sílice (350 g), sirviendo una mezcla de tetraclorocarbono-acetato de etilo (6:4) como eluyente. Las fracciones que contienen el producto se reúnen y se evaporan. El aceite incoloro obtenido se seca en alto vacío.

10

15

DC: (cloroformo-metanol (85:15)) R<sub>f</sub> 0,69

20

(tolueno-acetona (7:3)) R<sub>f</sub> 0,59

Etapa 12.2

25

H-Gaba-OTmse

A través de una solución de 4,70 g de Z-Gaba-OTmse (etapa 12.1) en 50 cc de isopropanol se conduce hidrógeno después de agregar 0,5 g de paladio-carbón (10 %) hasta que en el cromatograma de capa delgada (cloroformo-metanol (85:15)) ya no se pueda demostrar ningún producto de partida más. El catalizador se separa por

30

filtración y el filtrado se evapora en vacío. El producto en bruto oleinoso obtenido se emplea directamente para la siguiente etapa.

Etapa 12.3

5

Z-Phe-Gaba-OTmse

A una solución de 4,60 g de Z-Phe-OH y 2,83 g de H-Gaba-OTmse (etapa 12.2) en 15 cc de cloruro metilénico se agrega a 0 - 5° una solución de 3,75 g de diciclohexilcarbodiimida en 5 cc de cloruro metilénico. La mezcla de reacción se mantiene a continuación durante 15 minutos a 5° y seguidamente durante 2 horas a temperatura ambiente, se separa por filtración del DCH precipitado y el filtrado se evapora. El residuo se recristaliza para su purificación tres veces en acetato de etilo (12 cc) y éter de petróleo (60 cc), P.f. 88 - 93,5° (descomposición). (DCH = diciclohexilúrea)

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,72  
(tolueno-acetona (7:3))  $R_f$  0,44

20

Etapa 12.4

Z-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse

Una solución de 3,93 g de H-Phe-Gaba-OTmse / obtenida de 5,42 g de Z-Phe-Gaba-OTmse (etapa 12.3) por hidrogenación análogo a la etapa 12.2/ y 5,45 g de Z-Thr(But)-ONSu en 25 cc de dimetilformamida se mantiene durante 15 horas a temperatura ambiente, se mezcla con 0,34 cc de dimetilaminopropilamina y se deja durante otra hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evapora en alto vacío, el residuo se disuelve en unos 200 cc de acetato de

30

etilo y se lava tres veces, cada una con 30 cc de una solución acuosa al 5 % de ácido tartárico y tres veces, cada una con 30 cc de agua. La fase orgánica secada sobre sulfato sódico se evapora en vacío y el residuo se recrystaliza dos veces en acetato de etilo (10cc) -éter de petróleo (80 cc), P.f. 114 - 117° (descomposición).

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,75

(tetraclorocarbono-acetato de etilo (6:4))  $R_f$  0,39

#### Etapa 12.5

#### Z-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse

A una solución de 2,37 g de H-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse [obtenida de 3,00 g de Z-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse por hidrogenación análogo a la etapa 12.27], 1,96 g de Z-Lys(Boc)-OH y 0,70 g de N-hidroxibenzotriazol en 10 cc de cloruro metilénico se agrega a 0° - 5° una solución de 1,25 g de DCCI en 5 cc de cloruro metilénico. Después de 15 minutos a 0 - 5° se mantiene la mezcla durante 15 horas a temperatura ambiente. La diciclohexilúrea precipitada se separa por filtración, el filtrado se evapora en vacío y el residuo se disuelve y precipita 3 veces en acetato de etilo (20 cc) -éter de petróleo (100 cc).

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,73

(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,87.

#### Etapa 12.5A

#### Bpoc-Phe-[D-Trp(NO<sub>2</sub>)]-OH

Una suspensión de 0,50 g de 6-nitro-D-triptofano y

1,10 g de Bpoc-Phe-ONSu en 10 cc de una mezcla de dimetilformamida-  
 agua (8:2) se trata a temperatura ambiente con lejía sódica 0,1-n  
 de manera que el pH se mantenga en un valor 7,5. Después de 2,5  
 horas asciende el consumo total del lejía sódica a 31,5 cc. La mezcla  
 5 de reacción se enfría a 0 - 5° y lentamente se mezcla con 31,5 cc  
 de ácido clorhídrico 1-n. El producto en bruto precipitado se separa  
 por filtración, se seca y se cromatografía dos veces a través de  
 una columna de gel de sílice (en cada caso 60 g de adsorbente) con  
 una mezcla de cloroformo-metanol (85:15) y tetraclorocarbono-ace-  
 10 tato de etilo (6:4) como eluyente.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,12  
 (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,50

Etapa 12,6

15

Bpoc-Phe- $\overline{D}$ -Trp(NO<sub>2</sub>)-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse

A una solución de 1,08 g de H-Lys(Boc)-Thr(But)-  
 phe-Gaba-OTmse  $\square$  obtenida de 1,30 g de Z-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-  
 20 Gaba-OTmse (etapa 12.5) por hidrogenación análogo a la etapa 12.27.  
 0,93 g de Bpoc-Phe- $\overline{D}$ -Trp(NO<sub>2</sub>)-OH (etapa 12.5A) y 0,22 g de N-  
 hidroxibenzotriazol en 8 cc de cloruro metilénico se agrega a 0 - 5°  
 una solución de 0,36 g de DCCI en 2 cc de cloruro metilénico. Des-  
 pués de 15 minutos a 0 - 5° se mantiene la mezcla durante 4 horas  
 25 a temperatura ambiente. Para la elaboración se separa la dicitlo-  
 hexilúrea precipitada por filtración, el filtrado se evapora en  
 vacío y el residuo se disuelve y precipita en una mezcla de acetato  
 de etilo (10 cc) y éter de petróleo (70 cc) y a continuación se  
 frota con metanol (10 cc).

30 DC: (tolueno-acetona (7:3))  $R_f$  0,20

(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,90

Etapa 12.7

5 HCl . H-Phe- $\overline{D}$ -Trp(NO<sub>2</sub>) $\overline{L}$ -Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse

10 Una solución de 1,27 g de Bpoc-Asn-Phe-Phe- $\overline{D}$ -  
Trp(NO<sub>2</sub>) $\overline{L}$ -Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse (etapa 12.6) en una mez-  
cla de 27 cc de trifluoretanol y 3 cc de agua se mantiene mediante  
15 adición lenta de una mezcla de trifluoretanol con ácido clorhídrico  
concentrado (9:1) en un pH aparente de 1,5 (electrodo de vidrio,  
aparato de titración automático). Hasta terminar la reacción se con-  
sumen durante 1,5 horas a temperatura ambiente aproximadamente 0,76 cc  
del reactivo. El producto en bruto obtenido después de la evaporación  
15 en vacío se agita durante 1 hora con 30 cc de éter y después se  
separa por filtración.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,55.

Etapa 12.7A

20

2-trimetilsililetil-N-hidroxi-succinimidocarbonato (SEOC-ONSu)

25 A una solución de 100 g de cloroformiato de N-hidro-  
xisuccinimida y 73,2 g de 2-trimetilsililetanol en 160 cc de clo-  
ruro metilénico se gotean a 0 - 5° 62,6 g de N-metilmorfolina en el  
transcurso de 15 minutos. La mezcla se agita durante 2 horas a 0 - 5°,  
para la elaboración se mezcla con 1 litro de éter y se lava dos  
veces, cada una con 200 cc de HCl 1-n, 200 cc de agua, 200 cc de so-  
lución al 5 % de hidrogenocarbonato sódico y 3 veces con 200 cc de  
30 agua. Las fases acuosas se extraen ulteriormente con 0,5 litros de

éter y las fases orgánicas reunidas se secan sobre sulfato sódico y evaporan. El residuo se disuelve y precipita en 360 cc de diisopropiléter y los cristales formados se separan por filtración y se lavan con 150 cc de hexano. P.f. 101 - 102°.

5

Etapa 12.7B

SEOC-Asn-OH

10

En una solución de 2,64 g de L-asparagina en 80 cc de una mezcla de dimetilformamida-agua (6:2) se ajusta el pH a 7,5 mediante adición de 0,21 cc de lejía sódica l-n y después, siempre manteniendo un pH de 7,5 mediante adición de ulteriores cantidades de lejía sódica l-n mediante un aparato titrador automático, se

15 gotea una solución de 5,19 g de SEOC-ONSu (etapa 12.7A) en 10 cc de dimetilformamida, en el transcurso de 1 hora. Después de 2,5 horas se separa por filtración una pequeña cantidad de material sin disolver y el filtrado se mezcla con una cantidad de ácido clorhídrico diluido que es equivalente a la cantidad de lejía sódica l-n consumida (unos 20 cc). La solución se evapora en alto vacío y el residuo se frota con 30 cc de agua fría y se filtra, P.f. 144,5 -

20 146,5° (descomposición).

DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,15

25

Etapa 12.7C

SEOC-Asn-ONSu

30

A una solución de 1,72 g de SEOC-Asn-OH (etapa 12.7B) en una mezcla de 20 cc de acetato de etilo y 10 cc de dimetilformamida

se agregan 0,79 g de N-hidroxi-succinimida y la solución enfriada a 0 - 5° se mezcla con 1,54 g de DCCI. Después de 2 horas a 0 - 5° se separa por filtración la diciclohexilúrea precipitada, el filtrado se diluye con 150 cc de acetato de etilo y se lava tres veces, cada una con 50 cc de solución al 1 % de ácido oxálico y cuatro veces, cada una con 50 cc de agua. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico y se evapora en vacío; la espuma obtenida se emplea sin ulterior purificación en la siguiente etapa.

DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,75

Etapa 12.7D

SEOC-Asn-Phe-OH

A una suspensión de 0,64 g de fenilalanina y 1,44 g de SEOC-Asn-ONSu (etapa 12.7C) en una mezcla de 5 cc de dimetilformamida y 5 cc de agua se gotea en el transcurso de  $\frac{1}{2}$  hora a temperatura ambiente lejía sódica 1-n mediante un aparato de titración automático a una velocidad tal, de manera que se mantenga el pH de 7,5. Para la elaboración se separa por filtración una pequeña cantidad del material que no se ha disuelto y el filtrado se mezcla a 0 - 5° con una cantidad de ácido clorhídrico diluido (aproximadamente 4,2 cc en solución 1-n), que sea equivalente a la cantidad de lejía sódica consumida. El producto en bruto precipitado se seca sobre pentóxido de fósforo y se recristaliza en 40 cc de acetato de etilo; P.f. 156 - 158° (descomposición).

DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,33

Etapa 12.8

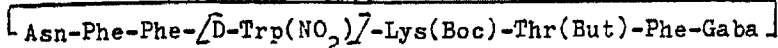
SEOC-Asn-Phe-Phe- $\sqrt{D}$ -Trp(NO<sub>2</sub>) $\sqrt{}$ -Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse

- 5 Una solución de 500 mg de HCl.H-Phe- $\sqrt{D}$ -Trp(NO<sub>2</sub>) $\sqrt{}$ -Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse (etapa 12.7), 202 mg de SEOC-Asn-Phe-OH (etapa 12,7D), 65 mg de N-hidroxibenzotriazol y 44 mg de N-metilmorfolina en 5 cc de dimetilformamida se enfría a 0° y se mezcla con 116 mg de DCCI, se mantiene durante 15 minutos a 0 - 5° y
- 10 durante 6 horas a temperatura ambiente. La diciclohexilúrea precipitada se separa por filtración, el filtrado se evapora en alto vacío y el residuo se frota con 20 cc de agua y se separa por succión. El producto en bruto se vuelve a frotar aún dos veces, cada una con 4 cc de metanol y se separa por filtración.
- 15 DC: (cloroformo-metanol (85:15)) R<sub>f</sub> 0,80  
(cloroformo-metanol-agua (14:6:1)) R<sub>f</sub> 0,90

Etapa 12.9

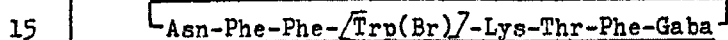
20 H-Asn-Phe-Phe- $\sqrt{D}$ -Trp(NO<sub>2</sub>) $\sqrt{}$ -Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OH

- 25 530 mg de SEOC-Asn-Phe-Phe- $\sqrt{D}$ -Trp(NO<sub>2</sub>) $\sqrt{}$ -Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-Tmse (etapa 12.8) se disuelve en 46,7 cc de solución de fluoruro de tetraetilamonium 0,15-molar anhidro, recién preparada, en dimetilformamida y se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución se enfría a 0 - 5°, se mezcla bajo buena agitación con 0,70 cc de ácido clorhídrico 1-n y se concentra en alto vacío a 3 cc. El producto se precipita mediante adición de 30 cc de agua.
- 30 DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1)) R<sub>f</sub> 0,45

Etapas 12.10

5 En forma análoga a como descrito en el ejemplo 1 se obtiene el H-Asn-Phe-Phe- $\overline{\text{D-Trp(NO}_2\text{)}}\text{-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OH}$  (etapa 12.9) por ciclización mediante DCCI y N-hidroxibenzotriazol. El producto en bruto se purifica por distribución en contracorriente (K = 1,08)✓

10 DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,45  
(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,60

Ejemplo 13

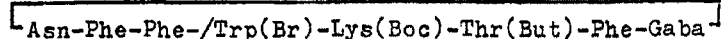
El símbolo  $\overline{\text{Trp(Br)}}$  significa 5-bromo-L-triptofano). La síntesis del compuesto del título se realiza bajo las mismas condiciones como la síntesis del ejemplo 12 anterior, pero empleando 5-bromo-L-triptofano en lugar de 6-nitro-D-triptofano en los correspondientes productos de partida y productos intermedios.

Distribución en contracorriente:

320 etapas, K = 9,0

25 DC: Sistema 101 :  $R_f$  0,60  
111B :  $R_f$  0,40  
112A :  $R_f$  0,52

El producto de partida de fórmula



se obtiene de la manera siguiente:

Etapa 13.1

5 Bpoc-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\text{-OH}$

En forma análoga a como descrito en el ejemplo 12.5A se hacen reaccionar 0,57 g de 5-bromo-L-triptofano con 1,00 g de Bpoc-Phe-ONSu.

10 DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,15  
(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,55

Etapa 13.2

15 Bpoc-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\text{-Lys}(\text{Boc})\text{-Thr}(\text{But})\text{-Phe-Gaba-OTmse}$

Una mezcla de 0,57 g de Bpoc-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\text{-OH}$  (etapa 13.1), 0,63 g de H-Lys(Boc)-Thr(But)-Phe-Gaba-OTmse (ejemplo 12.5), 0,13 g de N-hidroxibenzotriazol y 0,21 g de DCCI se hacen reaccionar en forma análoga a como indicado en el ejemplo 12.6. Para la purificación se disuelve el producto en bruto en 10 cc de metanol caliente y se precipita por enfriamiento.

20 DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,80  
(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,90

25

Etapa 13.3

HCl.H-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\text{-Lys}(\text{Boc})\text{-Thr}(\text{But})\text{-Phe-Gaba-OTmse}$

30

Análogo al ejemplo 12.7 se tratan 0,84 g de Bpoc-

Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\overline{\text{Lys}}(\text{Boc})\text{-Thr}(\text{But})\text{-Phe-Gaba-OTmse}$ .

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,65

(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,90

5 Etapa 13.4

SEOC-Asn-Phe-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\overline{\text{Lys}}(\text{Boc})\text{-Thr}(\text{But})\text{-Phe-Gaba-OTmse}$

10 Análogo al ejemplo 12.8 se copulan 700 mg de HCl.H-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\overline{\text{Lys}}(\text{Boc})\text{-Thr}(\text{But})\text{-Phe-Gaba-OTmse}$  (etapa 13.3) y 250 mg de SEOC-Asn-Phe-OH (ejemplo 12.7D) mediante 146 mg de DCCI en presencia de 88 mg de N.hidroxibenzotriazol y 60 mg de N-metilmorfolina.

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,77

(cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,85

15

Etapa 13.5

H-Asn-Phe-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\overline{\text{Lys}}(\text{Boc})\text{-Thr}(\text{But})\text{-Phe-Gaba-OH}$

20 Análogo al ejemplo 12.9 se disocian en 500 mg de SEOC-Asn-Phe-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\overline{\text{Lys}}(\text{Boc})\text{-Thr}(\text{But})\text{-Phe-Gaba-OTmse}$  (etapa 13.4) el grupo SEOC y el grupo Tmse simultáneamente.

DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,50

25 Etapa 13.6

Asn-Phe-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\overline{\text{Lys}}(\text{Boc})\text{-Thr}(\text{But})\text{-Phe-Gaba}$

30 Por ciclización de H-Asn-Phe-Phe- $\overline{\text{Trp}}(\text{Br})\overline{\text{Lys}}(\text{Boc})\text{-Thr}(\text{But})\text{-Phe-Gaba-OH}$  mediante DCCI y N-hidroxibenzotriazol según el

procedimiento descrito en el ejemplo 1.10, se obtiene un producto en bruto que se purifica por distribución en contracorriente ( $K = 0,86$ ).

DC: (cloroformo-metanol (85:15))  $R_f$  0,06

5 (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,85

Ejemplo 14

Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys-Thr- $\overline{\text{Phe(I)}}$ -Gaba

10

130 mg de Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr- $\overline{\text{Phe(I)}}$ -

Gaba] se tratan análogo al ejemplo 1 con ácido trifluoracético y mediante intercambiador de iones se transforma en el acetato. La purificación se efectúa por distribución en contracorriente en el mismo sistema indicado en el ejemplo 1;  $K = 9$ .

15

DC: (gel de sílice Merck); Sistema 157C :  $R_f$  0,25

(El símbolo Ph(I) significa p-iodo-L-fenilalanina).

El producto de partida se obtiene de la manera siguiente:

20

Etapa 14.1

Z-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr-OMe

25

Una solución de 2,78 g de Z-(D-Trp)-Lys(Boc)-OH (ejemplo 1.3A) 0,85 g de hidrocloreuro de H-Thr-OMe y 0,77 g de N-hidroxibenzotriazol en 16 cc de acetonitrilo se mezcla a  $-5^\circ$  con 0,56 cc de N-metilmorfolina y 1,03 g de DCCI. Después de 15 horas a  $-5^\circ$  se elabora la mezcla análogo a la etapa 14.3B. El producto se recristaliza en acetato de etilo-hexano; P.f. 120 - 122 $^\circ$ .

30

DC: Sistema 157A :  $R_f$  0,47

Etapa 14.1ASEOC-Asn-Phe-Phe-OH

5 Una solución de 2,24 g de Z-Asn-Phe-Phe-OH en 40 cc de dimetilformamida se hidrogena bajo adición de 0,23 g de Pd-carbón (10 %) durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de separar el catalizador por filtración se concentra la solución en alto vacío a unos 5 cc y en ésta forma se sigue elaborando directamente.

10 Una solución de 1,71 g conteniendo H-Asn-Phe-Phe-OH en 15 cc de dimetilformamida se mezcla con 10 cc de agua y la suspensión obtenida se mantiene, después de agregar 1,04 g de SEOC-ONSu por lenta adición de lejía sódica 2-n mediante un aparato titrador automático durante 2 horas (temperatura ambiente) a un pH de 7,5. Después de

15 una ulterior adición de 1,04 g de SEOC-ONSu se deja aún durante 4 horas a un pH de 7,5. Para la elaboración se separa la solución del poco material no disuelto, el filtrado se mezcla a 0 - 5° con una cantidad de ácido clorhídrico equivalente al hidróxido sódico consumido (aproximadamente 8,0 cc de solución 2-n), el producto precipitado se separa por filtración y se seca. El producto en bruto se

20 disuelve y precipita en cada caso una vez en 10 cc de metanol con 100 cc de éter y en 10 cc de metanol con 80 cc de agua, P.f. 176 - 182° (descomposición).

DC: (cloroformo-metanol-agua (14:6:1))  $R_f$  0,30

25

Etapa 14.2SEOC-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr-OMe

30

Una solución de 340 mg de Z-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr-OMe

(etapa 14.1) en una mezcla de 15 cc de metanol y agua (9:1) se hidrogena en presencia de 50 mg de paladio-carbón (10 %) y bajo adición de ácido clorhídrico 0,2-n en el mismo disolvente a un pH de 4,5.

Después de separar el catalizador por filtración se concentra el filtrado en vacío y se evapora aún dos veces con dimetilformamida.

La solución residual (en total 1,5 g) se mezcla con 285 mg de SEOC-Asn-Phe-Phe-OH (etapa 14.1A) y 90 mg de N-hidroxibenzotriazol.

A  $-5^{\circ}$  se agregan 0,056 cc de N-metilmorfolina en 123 mg de DCCI y se deja durante 18 horas a  $-5^{\circ}$ . La elaboración se realiza análogo

al ejemplo 7.1; El producto en bruto se recristaliza en trifluoro-etanol acuoso.

DC: Sistema 157A :  $R_f$  0,45

#### Etapa 14.3

#### Hidrazida de SEOC-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr

Una solución de 355 mg de SEOC-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr-OMe (etapa 14.2) en 1,1 cc de dimetilformamida se mezcla a temperatura ambiente con 0,16 cc de hidrato de hidrazina.

Después de 2½ horas se frota la masa sólida con 5 cc de agua el precipitado se separa por succión y se lava con agua hasta retirar totalmente la hidrazina. El producto que queda después de frotar con metanol es unitario.

DC: Sistema 157B :  $R_f$  0,25

#### Etapa 14.3A

#### Bos- $\overline{\text{Phe(I)}}$ -OH

Una solución de 2,9 g de p-iodo-L-fenilalanina en

10 cc de lejía sódica 1-n y 25 cc de terc.-butanol se mezcla con 2,4cc de dicarbonato de di-terc.-butilo y a temperatura ambiente se sigue agitando durante otras 3 horas y se deja después reposar durante 20 horas. La solución de reacción se reparte entre agua y hexano; la fase orgánica se desecha y la fase acuosa se acidifica enfriando con hielo, el producto se recoge en acetato de etilo y el disolvente se evapora en vacío. El producto se purifica por cristalización en tetraclorocarbono; P.f. 118 - 120°.

DC: Sistema 157B :  $R_f$  0,35

Etapa 14.3B

Boc- $\overline{\text{Phe}}(I)$ -Gaba-OTmse

Una solución de 406 mg de H-Gaba-OTmse (ejemplo 12.2) 782 mg de Boc- $\overline{\text{phe}}(I)$ -OH (etapa 14.3A) y 306 mg de N-hidroxibenzo-triazol en 5 cc de acetonitrilo y 3 cc de dimetilformamida se mezclan a +5° con una solución de 412 mg de DCCI en 1 cc de dimetilformamida. Después de 20 horas a 5° se separa por filtración la dicitclohexil-úrea obtenida, el filtrado se diluye con acetato de etilo y se agita con ácido clorhídrico diluido y solución de hidrogenocarbonato sódico. Después de secar sobre sulfato sódico el disolvente se evapora y el producto se recristaliza en hexano; P.f. 98 - 100°.

DC: (ciclohexano-acetona (7:3))  $R_f$  0,35

Sistema 157A

$R_f$  0,68

Etapa 14.3 CHidrocloreuro de H- $\overline{\text{Phe(I)}}$ -Gaba-OTmse

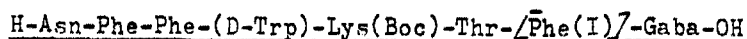
5 Una solución de 345 mg de Boc- $\overline{\text{Phe(I)}}$ -Gaba-OTmse (etapa 14.3 B) en 0,7 cc de una mezcla de trifluoretanol-agua (9:1) se mezcla a temperatura ambiente con 1,5 cc de ácido clorhídrico 1,2-n en el mismo disolvente. Después de 30 minutos se mezcla la mezcla con 10 cc de terc.-butanol y se concentra en vacío a aproximadamente la mitad. Este proceso se repite aún tres veces, después se retira el terc.-butanol restante por liofilización. El residuo se recristaliza en isopropanol-éter.

DC: Sistema 157C : R<sub>p</sub> 0,68

15 Etapa 14.4SEOC-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr- $\overline{\text{Phe(I)}}$ -Gaba-OTmse

20 Una solución de 320 mg de hidrazida de SEOC-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr (etapa 14.3) en 2 cc de dimetilformamida se mezcla a -15° hasta -20° con 0,14 cc de ácido clorhídrico 5,3-n en dioxano y 0,04 cc de nitrito terc.-butílico y se agita durante 15 minutos a ésta temperatura. A continuación se agregan a -25° una solución de 193 mg de hidrocloreuro de H- $\overline{\text{Phe(I)}}$ -Gaba-OTmse 25 (etapa 14.3C) en 0,5 cc de dimetilformamida y 0,18 cc de N-metilmorfolina, se calienta lentamente a 0° y se deja durante 16 horas a ésta temperatura. El producto se precipita por goteado en agua y se purifica frotando con metanol y acetonitrilo.

DC: (cloroformo-trifluoretanol-metanol (80:15:5)) R<sub>f</sub> 0,43

Etapa 14.5

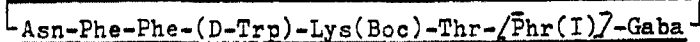
5 Una solución de 324 mg de SEOC-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr- $\overline{\text{Phe(I)}}\text{-Gaba-OTmse}$  (etapa 14.4) en 2 cc de dimetilformamida se mezcla con 12,3 cc de fluoruro de tetraetilamonium 0,34-molar en sulfóxido dimetílico y se deja durante 1 1/2 horas a 30°. El producto se precipita por goteado en 40 cc de agua enfriada con hielo, que contiene 0,41 cc de ácido clorhídrico 1-n y después de secar se emplea para la siguiente etapa.

10

DC: Sistema 157 :  $R_f$  0,5

Etapa 14.6

15



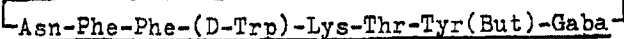
Una solución de 258 mg de H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr- $\overline{\text{Phe(I)}}\text{-Gaba-OH}$ , 300 mg de N-hidroxibenzotriazol y 410 mg de DCCI en 200 cc de dimetilformamida se deja durante 20 horas a 50°. La elaboración y purificación se efectúa análogo al ejemplo 8.2;  $K = 1,1$ .

20

DC: Sistema 157 A :  $R_f$  0,22

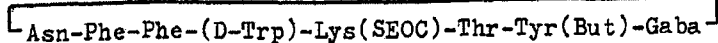
Ejemplo 15

25



Una solución de 350 mg de

30



en 1,2 cc de dimetilformamida se mezcla con 0,7 cc de fluoruro de tetrabutylamonium 2,1-molar en sulfóxido dimetílico y se deja durante 20 horas a 30°. Después de mezclar con 20 cc de ácido acético 1-n y 50 cc de acetato de etilo se separa la fase acuosa, la fase orgánica se extrae aún dos veces con poca agua y las soluciones acuosas reunidas se concentran en vacío y se liofilizan. El residuo, que se compone de una mezcla del producto y de fluoruro de tetrabutylamonium se separa por DC preparativa en gel de sílice con el sistema 157C. El producto aislado de gel de sílice, aún no totalmente puro, se purifica por distribución en contracorriente en el sistema cloroformo-tetraclorocarbono-metanol-acetato amónico 0,05-molar (9:1:7:3) a través de 460 etapas. El producto puro (K = 0,9) se aísla en la forma usual.

DC (gel de sílice Merck): Sistema 157 C :-  $R_f$  0,25

El producto de partida se obtiene como sigue:

#### Etapa 15.1

#### Trifluoracetato de Z-(D-Trp)-Lys-OH

3,4 g de Z-(D-Trp)-Lys(Boc)-OH (ejemplo 1.3A) se introducen bajo enfriamiento con hielo en 34 cc de una mezcla de ácido trifluoroacético-agua (9:1), conteniendo 0,5 cc de 2-mercapto-etanol y, tan pronto como se haya disuelto se deja aún durante 40 minutos a 23°. El producto en bruto se precipita mediante goteado en 400 cc de éter y 150 cc de hexano y se disuelve en 30 cc de agua. Después de reposar a temperatura ambiente durante 18 horas se liofiliza la solución y el residuo se emplea directamente en la siguiente etapa.

DC: Sistema 157:  $R_f$  0,35

Etapa 15.2Z-(D-Trp)-Lys(SEOC)-OH

5 Una solución de 3,0 g de trifluoracetato de Z-(D-Trp)-Lys-OH (etapa 15.1) y 1,47 g de (2-trimetilsililetil)-(N-hidroxi)-succinimidocarbonato (ejemplo 12.7A) en 5,2 cc de dimetilformamida se mezcla a temperatura ambiente con 0,87 cc de trietilamina y se deja reposar durante 15 horas. Después de diluir con acetato de etilo se acidifica con ácido clorhídrico a un pH de 1-2, la solución acetatoétilica se lava con agua, se seca sobre sulfato sódico y se evapora. El producto en bruto se purifica por distribución en contracorriente a través de 140 etapas en el mismo sistema como descrito en el ejemplo 1.10; K = 0,75.

10 DC: Sistema 157C: R<sub>f</sub> 0,55

Etapa 15.3Z-(D-Trp)-Lys(SEOC)-Thr-OMe

20 Una solución de 3,16 g de Z-(D-Trp)-Lys(SEOC)-OH (etapa 15.2), 1,32 g de hidrocloreuro de H-Thr-OMe y 0,95 g de N-hidroxibenzotriazol en 25 cc de acetonitrilo se mezcla a -5° con 0,86 cc de N-metilmorfolina y 1,34 g de DCCI y se deja durante 16 horas a ésta temperatura. El filtrado obtenido después de separar por filtración la dicitclohexilúrea se diluye con acetato de etilo, se lava con ácido clorhídrico diluido y una solución de hidrogenocarbonato sódico y se seca sobre sulfato sódico. El residuo obtenido después de evaporar el disolvente se cromatografía en mezclas de acetato de etilo-hexano (7:3) hasta (9:1), a través de una columna

25

30

de gel de sílice. Las fracciones puras según el cromatograma de capa delgada se evaporan hasta sequedad.

DC: Sistema 157A:  $R_f$  0,38

5 Etapa 15.4

Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(SEOC)-Thr-OMe

Una solución de 1,31 g de Z-(D-Trp)-Lys(Boc)-Thr-OMe en 30 cc de metanol-agua (95:5) se hidrogena a través de 130 mg de paladio-carbón (10 %) durante 2 horas. Después de separar el catalizador por filtración se concentra el filtrado y se evapora 2 veces con dimetilformamida en alto vacío. La solución obtenida, que contiene 3,5 cc de dimetilformamida, se mezcla con 1,01 g de Z-Asn-Phe-Phe-OH (ejemplo 1.5A) y 330 mg de N-hidroxibenzotriazol, se enfría a  $-5^{\circ}$ , se trata con una solución de 440 mg de DCCI en 0,5 cc de dimetilformamida, se deja reposar durante 15 horas a  $0^{\circ}$  y a continuación se elabora análogo al ejemplo 7.1.

DC: Sistema 157A:  $R_f$  0,45

20

Etapa 15.5

Hidrazida de Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(SEOC)-Thr

25 Una solución de 2,0 g de Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(SEOC)-Thr-OMe en 6 cc de dimetilformamida se mezcla a temperatura ambiente con 0,85 cc de hidrato de hidrazina. Después de 2,15 horas se elabora como en el ejemplo 14.3. El producto no se puede controlar por DC debido a su solubilidad extraordinariamente difícil.

Etapa 15.5ASal de dietilamonium de Trt-Tyr(But)-OH

5 Una solución de 4,0 g de H-Tyr(But)-OH en 50 cc de cloroformo se mezcla con 6,7 cc de agua, 6,7 cc de dietilamina y bajo enfriamiento con hielo en el transcurso de 30 minutos con 7,05 g de trifenilclorometano. Después de otras 1  $\frac{1}{2}$  horas se separa la fase acuosa, la solución clorofórmica se agita dos veces, cada vez con  
10 una solución acuosa al 4 % de dietilamina y solución saturada de sal común, se seca sobre sulfato sódico y se libera en vacío del disolvente. El residuo se cristaliza en éter-éter de petróleo; P.f. 141 - 145°.

DC: (tolueno-acetona (1:1))  $R_f$  0,48

15

Etapa 15.5BTrt-Tyr(But)-ONSu

20 4,7 g de sal de dietilamonium de Trt-Tyr(But)-OH (etapa 15.5A) se agita bajo enfriamiento con hielo en 100 cc de acetato de etilo y cada vez con 10 cc de solución 0,5-molar de sulfato potásico e hidrogenosulfatopotásico. La solución de acetato de etilo se lava, después de separar la fase inferior, con agua y se  
25 seca con sulfato sódico y el disolvente se separa cuidadosamente por destilación en vacío. El residuo se disuelve en 50 cc de dimetilformamida, se mezcla con 1,1 g de N-hidroxisuccinimida y a 0° se mezcla con 1,94 g de DCCI y se deja durante 15 horas a +5°. Después de separar por filtración la díciclohexilúrea se precipita del  
30 filtrado con agua un producto en bruto que se cromatografía con cloro-

formo en una columna de gel de sílice. Las fracciones que contienen el producto según la DC, se reúnen y se recristaliza en metanol; P.f. 163 - 164°.

DC: (cloroformo-acetato de etilo (1:1))  $R_f$  0,53

5

Etapa 15.5C

Trt-Tyr(But)-Gaba-OBzl

10

A una suspensión de 580 mg de Trt-Tyr(But)-ONSu (etapa 15.5B) y 730 mg de p-toluenosulfonato de H-Gaba-OBzl (ejemplo 1.7A) en 1 cc de cloroformo puro se agregan 0,77 cc de N-metilmorfina y se deja durante 4 días a temperatura ambiente. Después de diluir con acetato de etilo se agita la solución bajo enfriamiento con hielo con solución 0,2-molar de hidrogenosulfato potásico y agua, la fase orgánica se seca sobre sulfato sódico y el disolvente se separa por destilación. El producto en bruto se cromatografía en gel de sílice. El producto puro se eluye con una mezcla de acetato de etilo-hexano (1:1) y se aísla en la forma usual.

15

20

DC: (tolueno-acetona (8:2))  $R_f$  0,5

Etapa 15.5D

Hidrocloruro de H-Tyr(But)-Gaba-OBzl

25

Una solución de 620 mg de Trt-Tyr(But)-Gaba-OBzl (etapa 15.5C) en 20 cc de una mezcla de trifluoretanol-agua (9:1) se mezcla mediante un aparato de titración automático a un pH de 3,5 con ácido clorhídrico 1,2-n en el mismo disolvente hasta que ya no haya más consumo. Después de agregar 20 cc de terc.-butanol se con-

30

centra en vacío. Esto se repite aún dos veces y el restante terc.-butanol se retira por liofilización. Para retirar el trifenilcarbinol se reparte el liofilizado entre agua y éter, la solución acuosa es a continuación liofilizada.

5 DC: Sistema 157B  $R_f$  0,5

Etapa 15.6

Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(SEOC)-Thr-Tyr(But)-Gaba-OBzl

10

Una solución de 975 mg de hidrazida de Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(SEOC)-Thr (etapa 15.5) en 7 cc de dimetilformamida se mezcla a  $-15^{\circ}$  hasta  $-20^{\circ}$  con 0,47 cc de ácido clorhídrico 4,6-n en dioxano y 0,11 cc de nitrito de terc.-butilo. Después de 15 minutos se le agregan a ésta mezcla de reacción a  $-25^{\circ}$  una solución de 385 mg de hidrocloreuro de H-Tyr(But)-Gaba-OBzl (etapa 15.5D) en 0,5 cc de dimetilformamida y 0,44 cc de N-metilmorfolina y la mezcla se deja reposar durante 15 horas a  $0^{\circ}$ . El producto se precipita con agua y se purifica frotando con acetonitrilo y metanol.

15

20 Debido a la insolubilidad del producto no se puede efectuar ningún control de DC.

Etapa 15.7

25

H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(SEOC)-Thr-Tyr(But)-Gaba-OH

Una solución de 1,1 g de Z-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(SEOC)-Thr-Tyr(But)-Gaba-OBzl en 30 cc de dimetilformamida se hidrogena en presencia de 100 mg de paladio-carbón (10 %) durante 3 horas. El catalizador se separa por succión, el filtrado se concentra

30

y el producto se precipita con agua. Se purifica mediante disolución en 5 cc de dimetilformamida y precipitación con 15 cc de metanol.

DC: Sistema 157 :  $R_f$  0,55

5 Etapa 15.8

Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys(SEOC)-Thr-Tyr(But)-Gaba

Una solución de 700 mg de H-Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-  
10 Lys(SEOC)-Thr-Tyr(But)-Gaba-OH (etapa 15.7), N-hidroxibenzotriazol  
y 1,11 g de DCCI en 540 cc de dimetilformamida se cicliza durante  
21 horas a 50°. La elaboración se efectua análogo al ejemplo 7.3.  
Se purifica por cromatografía en columna a través de gel de sílice,  
la sustancia pura se eluye con una mezcla de cloroformo-trifluor-  
15 etanol-metanol (87:5:8).

DC: Sistema 157B:  $R_f$  0,38

Ejemplo 16

20 A) Una solución inyectable conteniendo 2,0 mg del octa-  
péptido obtenido según el ejemplo 1

Asn-Phe-Phe-(D-Trp)-Lys-Thr-Phe-Gaba

(denominado a continuación como "sustancia activa") se obtiene de  
la manera siguiente:

25 1,0 mg de ácido acético glacial, 0,8 mg de acetato  
sódico, 8,0 mg de cloruro sódico y 2,0 mg de sustancia activa se  
disuelven en 0,7 cc de agua destilada y con agua destilada se com-  
pleta a 1 cc. La solución se calienta a 120°C durante 20 minutos en

el autoclave. El pH después de la esterilización es de 4,5.

B) Una solución inyectable conteniendo 0,5 mg de la sustancia activa se prepara de la manera siguiente:

5 0,5 mg de sustancia activa se disuelven en 0,7 cc de solución fisiológica de cloruro sódico y la solución se acidifica con ácido clorhídrico 0,1-n a un pH de 4,0. Con agua destilada se completa a 1 cc y se filtra en forma esteril.

10 En igual forma se emplean como sustancia activa los productos finales descritos en los ejemplos 2 hasta 15.

Ejemplo 17

A) Una solución inyectable con gelatina conteniendo 15 0,1 mg de sustancia activa (véase ejemplo 16) se prepara de la manera siguiente:

Una solución acuosa filtrada en forma esteril de la sustancia activa se mezcla bajo condiciones asépticas, bajo calentamiento, con una solución esterilizada de gelatina que contiene 20 fenol como agente de conservación, de manera que 1,0 cc de solución tenga la siguiente composición:

Sustancia activa	0,1 mg
Gelatina	150,0 mg
Fenol	4,7 mg
25 Agua destilada hasta	1,0 cc

La mezcla se llena en forma aséptica en viales de 1,0 cc.

B) Una solución inyectable análoga, conteniendo 0,5 mg 30 de la sustancia activa, se obtiene en igual forma como indicado más

arriba preparandose una mezcla de la siguiente composición:

Sustancia activa	0,5 mg
Gelatina	280,0 mg
Fenol	5,0 mg
5 Agua destilada hasta	1,0 cc

La mezcla se llena en forma aséptica en viales de 1,0 cc.

#### Ejemplo 18

10 Un preparado conteniendo 0,5 mg de sustancia activa (véase ejemplo 16) como sustancia seca esterilizada para inyectar se prepara de la manera siguiente:

15 0,5 mg de sustancia activa se disuelven en 1 cc de una solución acuosa de 20 mg de manita. La solución se filtra en forma estéril y bajo condiciones asépticas se llena en una ampolla de 2 cc, se enfría por congelación y se liofiliza. Antes del uso se disuelve el liofilizado en agua destilada. La solución se emplea por vía intramuscular ó intravenosa.

#### Ejemplo 19

20 Un preparado inyectable conteniendo la sustancia activa (véase ejemplo 16) como suspensión de polifosfatos se prepara de la siguiente manera:

25 A) Con 1,0 mg de sustancia activa:

30 La solución de 1,0 mg de sustancia activa y 9,0 mg de cloruro sódico en 0,5 cc de agua destilada se mezcla con una solución de 2 mg de polifosfato sódico "Calgon N" en 0,5 cc de agua destilada. La sus-

pensión obtenida tiene la siguiente composición:

	Sustancia activa	1,0 mg
	Polifosfato sódico ("Calgon N")	2,0 mg
	Cloruro sódico	9,0 mg
5	Agua destilada hasta	1,0 cc

La suspensión presenta un pH de 6,9. Es adecuada para aplicación intramuscular.

B) Con 0,5 mg de sustancia activa:

10 En igual forma como arriba indicado se prepara una suspensión de la siguiente composición:

	Sustancia activa	0,5 mg
	Polifosfato sódico ("Calgon 322")	1,0 mg
	Cloruro sódico	9,0 mg
15	Agua destilada hasta	1,0 cc

El pH de la suspensión asciende a 5,9.

#### Ejemplo 20

20 Un preparado inyectable conteniendo 0,3 mg de sustancia activa (véase ejemplo 16) en forma de un gel de aluminio de estearato oleginoso.

25 Un gel de estearato de aluminio al 2 % se prepara en la forma usual mediante suspensión de 1,0 g de monoestearato de aluminio en 49,0 g de aceite de cacahuete y calentamiento a continuación a 130°C durante 10 minutos. 15,0 mg de sustancia activa se suspenden con 0,3 g del gel de estearato de aluminio de arriba, se homogeniza y se diluye con la restante cantidad de gel de estearato de aluminio. El gel así obtenido tiene la siguiente composición:

Sustancia activa	0,3 mg
Monosteato de aluminio	20,0 mg
Aceite de cacahuete hasta	1,0 mg

La suspensión de gel de estearato de aluminio olegi-  
nosa es adecuada para aplicación intramuscular.

#### Ejemplo 21

Preparado inyectable conteniendo 0,5 mg de sustan-  
cia activa (véase ejemplo 16) como suspensión de depósito con sul-  
fato de dextrano.

Se disuelven en 0,4 cc de agua destilada 0,36 mg  
de ácido acético, 1,9 mg de trihidrato de acetato sódico, 0,8 mg  
de cloruro sódico y 0,5 mg de sustancia activa y se completa con  
agua destilada a 0,5 cc. A ésta solución se agregan bajo agitaciór  
0,5 cc de una solución al 1 % de sulfato de dextrano (peso molecular  
500 000), formandose un precipitado homogéneo. La suspensión obte-  
nida tiene la siguiente composición:

Sustancia activa	0,50 mg
Sulfato de dextrano MG 500 000	0,50 mg
Acido acético 100 %	0,36 mg
Trihidrato de acetato sódico	1,90 mg
Cloruro sódico	8,00 mg
Agua destilada hasta	1,00 cc

La suspensión acuosa es adecuada para inyección  
intramuscular y subcutánea.

Ejemplo 22Spray nasal

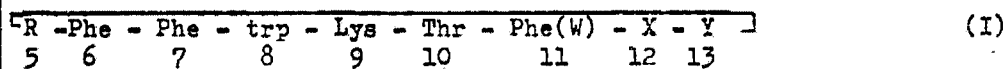
5                                   30 mg de sustancia activa finamente molturada (véase ejemplo 16) se suspenden en una mezcla de 75 mg de alcohol ben-  
cílico y 1,395 g de migliol 812. Con ésta suspensión se llenan mono-  
bloques de aluminio (contenido 10 cc) se cierran con una válvula do-  
sificadora y se llena con 6,0 g de Freon 12/114 (40:60) bajo pre-  
10                                   sión de nitrógeno. El bote de aluminio con un peso de carga de un  
total de 7,5 g contiene 100 dosis individuales de 0,3 mg de sustan-  
cia activa. El bote pulverizador se gradua mediante la válvula de  
manera que al presionar una vez se pulveriza una dosis individual.

15                                   En igual forma se preparan sprays nasales que en  
lugar de migliol contienen igual cantidad de miristato isopropílico  
ó palmitato isopropílico ó "Labrafac WL 1219" (una mezcla de ésteres  
de glicerina y polioxietilenglicol de ácidos grasos con 8 y 10 átomos  
de carbono).

20                                   Descrita suficientemente la naturaleza del invento,  
así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse cons-  
tar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles  
de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fun-  
damental.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la obtención de ciclopéptidos de fórmula



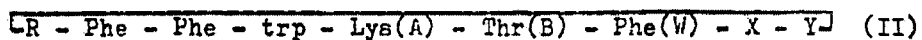
5 donde R significa Asn, Ala ó des-R, trp. significa D-trp ó L-trp que puede estar sustituido en el anillo bencénico por átomos de halógeno o grupos nitro, W significa un grupo hidroxilo, en caso dado eterado, que se encuentra en el anillo bencénico del resto L-fenilalanina como sustituyente, ó átomo de halógeno, o significa hidrógeno, X significa el

10 resto de un ácido  $\omega$ -amino-alcano inferior-(mono-ó di-)carboxílico con 6 átomos de carbono como máximo ó des-X e Y significa el resto de un ácido  $\omega$ -amino-alcano inferior-(mono- ó di)carboxílico con 6 átomos de carbono como máximo o des-Y, así como de las sales de adición de ácido

15 y complejos de los mismos, caracterizado porque se cicla un compuesto de fórmula



donde II' representa un resto correspondiente a la fórmula I, donde el enlace amídico entre dos restos aminoácido adyacentes arbitrarios del anillo péptido está interrumpido teniendo R, W, X, Y y trp el significado anteriormente indicado y C significa un grupo hidroxilo libre, un grupo hidroxilo modificado por un grupo de activación ó el grupo hidrazino  $-\text{NH}-\text{NH}_2$ , bajo protección del grupo  $\epsilon$ -amino del resto lisina, y en caso dado también se cicla el grupo hidroxilo del resto teonina y en un producto intermedio obtenido de fórmula:



25 donde R, W,X,Y y trp tienen los significados arriba indicados, A significa un grupo protector  $\epsilon$ -amino ó hidrógeno y B significa un grupo protector hidroxilo o hidrógeno, donde solo uno de los símbolos A y B

puede estar por hidrógeno, se disocia(n) el (los) grupo(s) protector(es), y, si se desea, de una sal de adición de ácido obtenida se libera la correspondiente base y/o una base obtenida se transforma en una sal de adición de ácido de la misma.

5                   2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque un producto de partida de fórmula II, donde como mínimo uno de los símbolos A y B significa un grupo acidolíticamente dissociable, se cicla y a continuación se disocian el o los grupos protectores por acidólisis.

10                   3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque un producto intermedio de fórmula II, donde A significa el grupo terc.butoxicarbonilo y B significa el grupo terc.butilo, se trata con ácido trifluoracético.

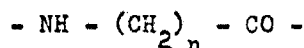
15                   4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en un compuesto de fórmula II donde A significa un grupo 2-(trihidrocarbilsilil)-etoxicarbonilo y B significa hidrógeno, y R, W, X, Y y trp tienen los significados indicados en la reivindicación 1, se cicla y a continuación se disocia el grupo protector amino mediante iones fluoruro.

20                   5.- Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque el símbolo A en la fórmula II significa 2-(trimetilsilil)-etoxicarbonilo.

25                   6.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque se prepara un compuesto de fórmula I, una sal de adición de ácido o un complejo del mismo, donde R significa Asn ó des-R, trp significa D-Trp ó L-Trp, W significa hidrógeno, X significa el resto de un ácido  $\omega$ -amino-alcano inferior-monocarboxílico con 6 átomos de carbono como máximo ó des-X, e Y significa un ácido  $\omega$ -amino-alcano inferior-monocarboxílico con 6 átomos de carbono como máximo ó des-Y.

30                   7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracte-

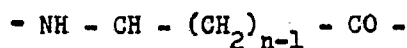
rizado porque se prepara un compuesto donde el resto de un ácido  $\epsilon$ -amino-alcano inferior-monocarboxílico está caracterizado por la fórmula



donde n es un número entero de 1 hasta 7.

5 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque n es un número entero de 2 hasta 4.

9.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se prepara un compuesto donde el resto de un ácido  $\omega$ -amino-alcano inferior-dicarboxílico está caracterizado por la fórmula

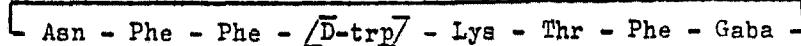


COOH

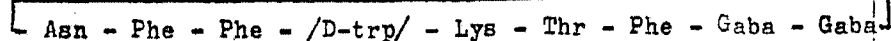
donde n significa un número entero de 1 hasta 5.

10.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque se prepara un compuesto donde R significa Asn ó des-R, el resto triptofano<sup>8</sup> tiene la configuración D y -X-Y juntos significan  $-\text{[Gaba]}_p-$ , donde p es igual a 0, 1 ó 2.

11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se preparan los compuestos de fórmula



20 12.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se preparan los compuestos de fórmula



25 13.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5 y 9, caracterizado porque un compuesto se prepara en forma de una sal de adición de ácido terapéuticamente utilizable o de un complejo.

14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones

2 a 6 y 10 a 12, caracterizado porque un compuesto se prepara en forma de una sal de adición de ácido terapéuticamente utilizable o de un complejo.

15 15.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se prepara el compuesto de partida de fórmula III caracterizado en la reivindicación 1 de tal forma que se obtiene preparando intermediariamente un péptido lineal de fórmula



10 donde II' representa un resto correspondiente a la fórmula II, caracterizada en la reivindicación 1, donde el enlace amídico entre dos restos de aminoácido adyacentes arbitrarios del anillo péptido está interrumpido, donde R significa Asn, Ala ó des-R, trp significa D-Trp ó L-Trp, que en el anillo benceno puede estar sustituido por átomos de halógeno o grupos nitro, W significa un grupo hidroxilo en caso dado eterado que se encuentra como sustituyente en el anillo benceno del resto L-fenilalana, ó átomo de halógeno, o hidrógeno, X significa el resto de un ácido W-amino-alcano inferior-(mono- ó di-)carboxílico ó des-X e Y significa el resto de un ácido W-amino-alcano inferior-(mono- ó di-)carboxílico o des-Y, A significa un grupo protector  $\Sigma$ -amino ó hidrógeno, B significa un grupo protector hidroxilo o hidrógeno y C significa un grupo hidroxilo libre, un grupo hidroxilo transformado por un grupo de activación ó el grupo hidrazino  $-NH-NH_2$ , condensando entre sí los aminoácidos o bien unidades de péptidos más pequeñas necesarias para su sintetización en secuencia temporal arbitraria, pudiéndose proteger intermediariamente los grupos funcionales que no participan en la reacción y, si se desea, un compuesto obtenido con un grupo carboxilo libre se transforma en un correspondiente éster activo y a continuación este producto intermedio de fórmula III se cicliza bajo protección del grupo -amino del resto lisina.

15

20

25

16.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el producto de partida de fórmula III caracterizada en la reivindicación 1, se prepara de tal forma que los aminoácidos necesarios para su preparación o bien las unidades péptidas mencionadas se condensan entre sí según una serie arbitraria, pudiéndose proteger los grupos funcionales que no intervengan en la reacción de forma intermedia, y en caso deseado un compuesto obtenido con grupos carboxilo libres se transforma en un éster activo correspondiente o en una hidrazida correspondiente y se cicla mediante protección temporal de los  $\epsilon$ -amino grupos del resto lisina y en caso dado también de los grupos hidroxilo del resto treonina.

17.- Procedimiento para la obtención de ciclopéptidos, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 90 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 30 NOV. 1979

~~CIBA-GEIGY, A.G.~~

~~A. M. GOMEZ ACEBO Y POMBO~~

~~p. p. Firmado: J. Suarez Diaz~~