



10 ES	11 NUMERO	19 AT
	473.925	
	12 FECHA DE PRESENTACION	
	3-10-78	

**PATENTE DE INVENCION**

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

14 PRIORIDADES: 15 NUMERO	16 FECHA	17 PAIS
838.516	3-10-77	ESTADOS UNIDOS
18 FECHA DE PUBLICIDAD	19 CLASIFICACION INTERNACIONAL	20 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07D 1/1961K	
21 TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN OLIGOPEPTIDO.		
22 SOLICITANTE (ES)		
ELI LILLY AND COMPANY		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS, Indiana 46206, Estados Unidos		
23 INVENTOR (ES)		
EDWARD LEE SMITHWICK, Jr. y ROBERT THEODORE SHUMAN, ambos de nacionalidad estadounidense y ROBERT CURTIS ARTHUR FREDERICKSON, de nacionalidad canadiense.		
24 TITULAR (ES)		
25 REPRESENTANTE		
D. BERNARDO UNGRIA GOLBURU		

BAD ORIGINAL

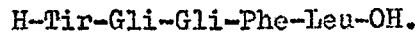
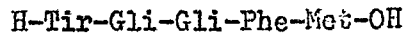
1

Esta invención se refiere a un procedimiento para preparar una nueva clase de compuestos que exhiben actividad analgésica al administrarse parenteralmente.

5

Recientemente, se han extraído sustancias endógenas que tienen propiedades similares a la morfina, del fluido espinal cerebral (Fes) o del cerebro de mamíferos. Estas sustancias, llamadas encefalinas, han sido identificadas por Hughes y otros, Nature, 258, 577 (1975) como pentapéptidos que tienen las siguientes secuencias:

10



Estos compuestos están designados como metionina-encefalina y leucina-encefalina, respectivamente.

15

Aunque estos compuestos han mostrado actividad analgésica en los ratones mediante administración intracerebroventricular [Buscher y otros, Nature, 261, 423 (1976)]<sup>7</sup>, prácticamente están exentos de alguna actividad analgésica útil cuando se administran parenteralmente.

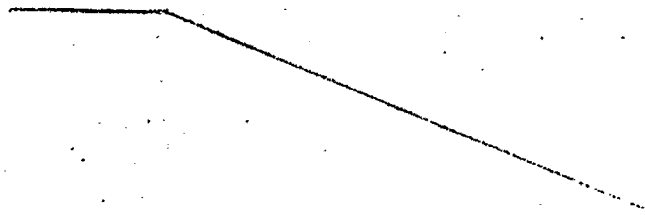
20

Se ha descubierto ahora un procedimiento para preparar una nueva clase de compuestos. Estos compuestos exhiben una actividad analgésica significativa y demostrable cuando se administran sistémicamente.

25

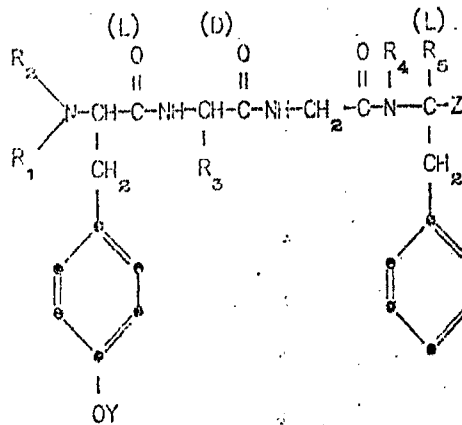
De esta manera, esta invención se refiere a un procedimiento para preparar una clase de compuestos que tienen la fórmula general

30



1

5



(I).....

10

y sus sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables, donde L y D, cuando corresponda, definen la quiralidad;

15

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente son hidrógeno o alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono; R<sub>3</sub> es alquilo primario o secundario de 1 a 4 átomos de carbono o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> es hidrógeno o alquilo primario de la 3 átomos de carbono; R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono; Y es hidrógeno o acetilo; y Z es  $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-C-NH}_2$ , -CH<sub>2</sub>OH, o -CN; con la limitación de que uno de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> es alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono y el otro es hidrógeno; que se caracteriza por disociar los agentes de bloqueo del compuesto correspondientemente protegido de fórmula (I) en medio ácido.

20

25

30

Las sales de adición de ácido, no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales de adición de ácido orgánicas e inorgánicas, por ejemplo, las preparadas a partir de ácidos tales como el clorhídrico, sulfúrico, sulfónico, tartárico, fumárico, bromhídrico, glicólico, cítrico, maléico, fosfórico, succínico, acético, nítrico, benzoico, ascórbico, p-toluensulfónico, bencensulfónico, naftalensulfónico y propiónico. Preferiblemente, las sales de adición

1 de ácido son las preparadas a partir de ácido clorhídrico, ácido acético o ácido succínico. Cualesquiera de las sales anteriores se preparan por métodos convencionales.

5 Como se notará de la definición de los diversos substituyentes que aparecen en la fórmula (I), los compuestos que se definen mediante esta estructura son derivados de amida primaria, de alcohol primario o de nitrilo de los tetrapéptidos específicamente definidos. La estereoconfiguración de los compuestos de fórmula (I) es un aspecto esencial de los mismos. Por conveniencia, los restos de los aminoácidos de los tetrapéptidos modificados de fórmula (I) se numeran secuencialmente, empezando con el resto en la función amino terminal. La quiralidad de los restos aminoácido, leyendo desde la posición 1 a la posición 3, es L, D y nula. El resto en la posición 3 es una porción de glicina y, de esta manera, no existe quiralidad en cuanto a este resto. En cuanto a la posición 4 (posición del carbono terminal) que es una amida primaria, un alcohol primario o un nitrilo, su quiralidad se define como la que está de acuerdo con el resto de L-aminoácido putativo, correspondiente.

15 Los grupos  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_4$  y  $R_5$ , según se utilizan en la presente memoria, se definen de modo que incluyen el grupo "alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono". Por el término "alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono", se quiere dar a entender el metilo, el etilo y el n-propilo.

25 El grupo  $R_3$  que aparece en la fórmula estructural anterior, se define de modo que incluye el grupo "alquilo primario o secundario de 1 a 4 átomos de carbono". Por el término "alquilo primario o secundario de 1 a 4 átomos de carbono" se quiere dar a entender el metilo, el etilo, el

1 n-propilo, el isopropilo, el n-butilo, el isobutilo y el  
sec-butilo.

Con respecto a los restos particulares en cada una  
de las posiciones de los tetrapéptidos modificados de la  
5 fórmula (I), prevalecen las siguientes consideraciones:

(A). Posición 1. ....

Esta posición representa la porción amino-terminal  
del péptido. El resto es el que resulta de la L-tirosina o  
L-(O-acetil)tirosina. En cualquier caso, el resto puede no  
10 estar N-sustituido, en cuyo caso, ambos de  $R_1$  y  $R_2$  son  
hidrógeno. Además, el resto puede estar sustituido por uno  
o dos grupos alquilo primarios de 1 a 3 átomos de carbono,  
en cuyo caso  $R_1$  y/o  $R_2$  es alquilo primario de 1 a 3 átomos  
de carbono. Son ejemplos específicos de la sustitución de  
15 alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono, el N-metil,  
el N-etil, el N-n-propil, el N,N-dimetil, el N,N-dietyl,  
el N,N-di-n-propil, el N-metil-N-etil, el N-metil-N-n-propil  
y el N-metil-N-n-propilo. Preferiblemente, el resto tirosilo  
u O-acetiltirosilo, que está presente en la Posición 1  
20 del péptido de la fórmula (I) no está N-sustituido. Además,  
se prefiere que el resto sea el tirosilo.

(B) Posición 2..

El resto aminoácido que está presente en la segun-  
da posición del péptido de la fórmula (I), debe ser el es-  
25 tereoisómero D, y es cualquiera de los diversos restos de  
aminoácido. Estos incluyen restos derivados de la D-alanina  
(Ala), ( $R_3$  es metilo), el ácido D- $\alpha$ -amino-butírico (Abu)  
( $R_3$  es etilo), la D-norvalina (Nva) ( $R_3$  es n-propilo), la  
D-valina (Val) ( $R_3$  es isopropilo), la D-norleucina (Nle)  
30 ( $R_3$  es n-butilo), la D-leucina (Leu) ( $R_3$  es isobutilo), la

1 D-isoleucina (Ile) ( $R_3$  es sec-butilo), y la D-metionina (Met) ( $R_3$  es  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$ ). Preferiblemente, el resto es el derivado de la D-alanina.

(C) Posición 3.

5 El resto de aminoácido presente en esta posición es el derivado de glicina (Gly).

(D). Posición 4.

10 El resto presente en la posición del carbono terminal, es el derivado de la L-fenilalanina (Phe) o su derivado nitrilo o alcohol primario. El resto puede ser una amida primaria ( $\text{Phe}-\text{NH}_2$ ) ( $Z$  es  $-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{NH}_2$ ), un alcohol primario ( $\text{Phe}-\text{A}$ ) ( $Z$  es  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ), o un nitrilo ( $\text{Phe}-\text{CN}$ ) ( $Z$  es  $-\text{CN}$ ). Una clase preferida de compuestos es aquella donde  $Z$  es  $-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{NH}_2$ .

15 El resto puede estar sustituido o no sustituido en el nitrógeno del amino ( $R_4$ ). En el caso de que el resto esté N-sustituido, éste es N-metilo, N-etilo, o N-n-propilo. Además, en el caso de que el resto no esté sustituido en el nitrógeno del amino, este debe estar sustituido en el carbono  $\alpha$  ( $R_5$ ). En dichos casos,  $R_5$  es metilo, etilo o n-propilo.

20 La única limitación es que uno de  $R_4$  y  $R_5$  sea alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono, y el otro sea hidrógeno. Más preferiblemente, el grupo alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono es metilo. De esta manera, los compuestos altamente preferidos son aquellos en los que  $R_4$  o  $R_5$  es metilo, y más preferiblemente, aquellos en los que  $R_4$  es metilo.

25 En esta memoria, se emplean las siguientes abreviaturas, la mayoría de las cuales son bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica:

Abu - ácido  $\alpha$ -aminobutírico

Ala - alanina

30

1	Cis - cisteína
	Gli - glicina
	Hse - homoserina
	Ile - isoleucina
5	Leu - leucina
	Met - Metionina
	Nle - norleucina
	Nva - norvalina
	Phe - fenilalanina
10	Phe-NH <sub>2</sub> - amida de fenilalanina
	Phe-A - derivado alcohol primario de fenilalanina
	Phe-CN - derivado nitrilo de fenilalanina
	Ser - serina
	Tir - tirosina
15	Val - valina
	Ac - acetilo
	Me - metilo
	Et - etilo
	Ip - isopropilo
20	Pr - n-propilo
	Bu - n-butilo
	i-Bu - isobutilo
	t-Bu - t-butilo
	s-Bu - sec-butilo
25	BOC - t-butiloxicarbonilo
	Bzl - bencilo
	DCC - N,N'-diciclohexilcarbodiimida
	HBT - 1-hidroxibenzotriazol
	DMF - N,N-dimetilformamida
30	TFA - ácido trifluoracético

1

THF - tetrahidrofurano

DEAE - dietilaminoetilo

DCHA - dicitclohexilamina.

Son ejemplos de los compuestos típicos de fórmula

5

(I) los siguientes:

H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Et)Phe-NH<sub>2</sub>;

H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Pr)Phe-NH<sub>2</sub>;

H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Pr)Phe-A;

H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Me)Phe-NH<sub>2</sub>;

10

H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Me)Phe-NH<sub>2</sub>;

H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Et)Phe-NH<sub>2</sub>;

H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Me)Phe-CN;

H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Me)Phe-A;

H-L-Tir-D-Met-Gli-L-(N-Et)Phe-NH<sub>2</sub>;

15

H-L-Tir-D-Met-Gli-L-(N-Me)Phe-NH<sub>2</sub>;

H-L-Tir-D-Met-Gli-L-(N-Me)Phe-A;

H-L-Tir-D-Met-Gli-L-(N-Et)Phe-CN;

H-L-Tir-D-Met-Gli-L-( $\alpha$ -Et)Phe-NH<sub>2</sub>;

H-L-Tir-D-Met-Gli-L-( $\alpha$ -Pr)Phe-NH<sub>2</sub>;

20

H-L-Tir-(Ac)-D-Ala-Gli-L-(N-Me)Phe-NH<sub>2</sub>;

H-L-Tir(Ac)-D-Nle-Gli-L-( $\alpha$ -Me)Phe-NH<sub>2</sub>;

(N-Et)-L-Tir-D-Abu-Gli-L-(N-Et)Phe-NH<sub>2</sub>;

(N,N-di-Pr)-L-Tir-D-Val-Gli-L-( $\alpha$ -Me)Phe-NH<sub>2</sub>;

(N-Pr)-L-Tir-D-Leu-Gli-L-( $\alpha$ -Et)Phe-NH<sub>2</sub>;

25

(N,N-Di-Et)-L-Tir-D-Met-Gli-L-( $\alpha$ -Pr)Phe-NH<sub>2</sub>;

(N-Me,N-Et)-L-Tir(Ac)-D-Nle-Gli-L-( $\alpha$ -Me)Phe-NH<sub>2</sub>;

(N,N-Di-Me)-L-Tir(Ac)-D-Ile-Gli-L-( $\alpha$ -Et)Phe-NH<sub>2</sub>;

(N-Me)-L-Tir(Ac)-D-Leu-Gli-L-( $\alpha$ -Me)Phe-CN;

(N-Me)-L-Tir-(Ac)-D-Nva-Gli-L-( $\alpha$ -Pr)Phe-A;

30

(N-Me)-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Me)Phe-NH<sub>2</sub>;

- 1 (N-Et)-L-Tir(Ac)-D-Abu-Gli-L-( -Pr)Phe-NH<sub>2</sub>;  
H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Me)Phe-CN;  
H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Me)Phe-A;  
H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Et)Phe-A;  
5 H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Pr)Phe-NH<sub>2</sub>;  
H-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Pr)Phe-CN;  
(N,N-Di-Me)-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Et)Phe-A;  
(N,N-Di-Me)-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Me)Phe-NH<sub>2</sub>;  
(N,N-Di-Et)-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Et)Phe-CN;  
10 (N-Me)-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Me)Phe-A;  
(N-Me)-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Me)Phe-NH<sub>2</sub>;  
(N,N-Di-Me)-L-Tir-D-Val-Gli-L-(N-Me)Phe-NH<sub>2</sub>;  
(N,N-Di-Pr)-L-Tir-D-Ala-Gli-L-(N-Pr)Phe-NH<sub>2</sub>;  
(N-Me)-L-Tir-D-Ala-Gli-L-( $\alpha$ -Et)Phe-NH<sub>2</sub>;  
15 (N,N-Di-Me)-L-Tir(Ac)-D-Ala-Gli-L-(N-Et)Phe-CN;  
(N,N-Di-Pr)-L-Tir(Ac)-D-Met-Gli-L-(N-Me)Phe-A;  
(N-Et)-L-Tir(Ac)-D-Met-Gli-L-(N-Pr)Phe-NH<sub>2</sub>; y  
(N-Me)-L-Tir(Ac)-D-Met-Gli-L-( $\alpha$ -Me)Phe-NH;

20 Los compuestos de fórmula (I) se preparan por métodos de rutina en la síntesis de péptidos. Es posible que durante la síntesis de algunos de los compuestos de fórmula (I), ocurra una racemización parcial. Sin embargo, el grado de racemización, si es que ocurre, no es suficiente para alterar seriamente la actividad analgésica de los compuestos de fórmula (I).

25 Los métodos para preparar los compuestos de fórmula (I), implican la copulación de fragmentos de aminoácidos o péptidos mediante reacción de la función carboxilo del uno con la función amino del otro, para producir un enlace amido. Para conseguir de forma efectiva el acoplamiento, es  
30

1 deseable, que todas las funcionalidades reactivas que no  
participan directamente en la reacción, se inactiven median-  
te el empleo de grupos de bloqueo apropiados y, en segundo  
lugar, que la función carboxilo que se va a copular, se  
5 active apropiadamente para permitir que tenga lugar la copu-  
lación. Todo esto implica una selección cuidadosa tanto de  
la secuencia de reacción como de las condiciones de reacción,  
así como también del empleo de grupos de bloqueo específicos,  
para obtener el péptido deseado. Cada uno de los aminoácidos  
10 que se emplean para producir los compuestos de fórmula (I),  
y que tiene los grupos protectores particularmente selec-  
cionados y/o las funcionalidades activadoras, se prepara  
empleando métodos bien conocidos en la técnica de los pépti-  
dos.

15 Se emplean combinaciones seleccionadas de grupos de  
bloqueo en cada punto de la síntesis total de los compues-  
tos de fórmula (I). Se ha encontrado que estas combinaciones  
particulares funcionan más uniformemente. Otras combina-  
ciones podrán operar en la síntesis de los compuestos de  
20 fórmula (I), aunque quizá, con un grado menor de éxito. De  
esta manera, pueden emplearse de forma variada grupos de  
bloqueo de amino, en la síntesis de los compuestos de fór-  
mula (I) tales como el benciloxicarbonilo (CBz), el t-butil-  
oxicarbonilo (BOC), el t-amiloxicarbonilo (AOC), el p-metoxi-  
25 benciloxicarbonilo (MBOC), el adamantiloxicarbonilo (AdOC),  
y el isoborniloxicarbonilo. Además, el bencilo (Bzl) gene-  
ralmente se emplea como grupo de protección de hidroxilo para  
el resto tirosilo, aún cuando podrían emplearse también  
otros, tales como p-nitrobencilo (PNB), p-metoxibencilo  
30 (PMB).

1 Los grupos de bloques de carboxilo empleados en la  
preparación de los compuestos de fórmula (I), pueden ser  
cualquiera de los grupos formadores de éster típicos, in-  
cluyendo, por ejemplo, metilo, etilo, bencilo, p-nitrobenci-  
5 lo, p-metoxibencilo y 2,2,2-tricloroetilo.

La copulación del fragmento de péptido o de amino-  
ácido N-bloqueado adecuadamente protegido, con un fragmento  
de péptido o de aminoácido carboxi-bloqueado, adecuadamente  
protegido, en la preparación de los compuestos de fórmula  
10 (I) consta de la transformación de la función carboxilo libre  
del fragmento de péptido o de aminoácido activo a la reac-  
ción de copulación. Esta puede lograrse utilizando cualquiera  
de las técnicas bien conocidas. Una de tales técnicas im-  
plica la conversión de la función carboxilo en un anhídrido  
15 mixto. La función carboxilo libre se activa mediante reac-  
ción con otro ácido, típicamente un derivado de ácido carbóni-  
co, tal como un cloruro de ácido del mismo. Son ejemplos  
de cloruros de ácido utilizados para formar anhídridos mix-  
tos, cloroformiato de etilo, cloroformiato de fenilo, cloro-  
20 formiato de sec-butilo, cloroformiato de isobutilo y cloru-  
ro de pivaloilo. Preferiblemente se emplea el cloroformiato  
de isobutilo.

Otro método para activar la función carboxilo con  
el propósito de realizar la reacción de copulación, es me-  
25 diante la conversión en su derivado de éster activo. Dichos  
ésteres activos incluyen, por ejemplo, éster 2,4,5-tricloro-  
fenílico, un éster pentaclorofenílico y un éster p-nitrofe-  
nílico. Otro método de copulación disponible para emplearse  
es el bien conocido método de copulación de azida.

30 El método de copulación preferido en la preparación

1 de los compuestos de fórmula (I) implica el empleo de N,N'-  
diciclohexilcarbodiimida (DCC) para activar la función car-  
boxilo libre, permitiendo por lo tanto, que tenga lugar la  
5 copulación. Esta técnica de copulación y activación se rea-  
liza empleando una cantidad equimolar de DCC con relación  
al fragmento de péptido o aminoácido, y se realiza en pre-  
sencia de una cantidad equimolar de 1-hidroxibenzotriazol  
(HBT). La presencia de HBT suprime las reacciones laterales  
indeseables, incluyendo la posibilidad de racemización.

10 La separación de los grupos de bloqueo selecciona-  
dos, es necesaria en puntos particulares de la secuencia  
sintética empleada en la preparación de los compuestos de  
la fórmula (I). Un químico con una experiencia ordinaria en  
la técnica de la síntesis de los péptidos puede seleccionar  
15 fácilmente entre los grupos de protección representativos  
los que sean compatibles en el sentido de que pueda lograr-  
se la separación selectiva del producto, permitiendo la se-  
paración de uno o más, pero menos de la totalidad de los gru-  
pos de protección presentes en el fragmento de péptido o  
20 aminoácido. Estas realizaciones son bien conocidas en la  
técnica de los péptidos. Una discusión más completa de las  
técnicas que hay disponibles para la separación selectiva  
se proporciona en la bibliografía en Schröder y Lübke, The  
Peptides, Volumen I, Academic Press, Nueva York, (1965), y  
25 especialmente en la Tabla proporcionada en las páginas 72-  
75 del mismo.

30 La separación de los grupos protectores de carboxi-  
lo puede lograrse mediante saponificación alcalina. Se em-  
plean generalmente condiciones alcalinas relativamente fuer-  
tes, utilizando típicamente un hidróxido de metal alcalino.

1 tal como un hidróxido de sodio, hidróxido de potasio e hidróxi-  
do de litio, para desesterificar el carboxilo protegido. Las  
condiciones de reacción en las que se logra la saponifica-  
ción, son bien conocidas en la técnica. Los grupos de blo-  
5 queo de carboxilo pueden también separarse mediante hidróge-  
nólisis catalítica, incluyendo, por ejemplo la hidrogenóli-  
sis en presencia de un catalizador tal como paladio sobre  
carbón. Además, en los casos en que el grupo de bloqueo de  
carboxilo es p-nitrobencilo o 2,2,2-tricloroetilo, el des-  
10 bloqueo puede lograrse mediante reducción en presencia de  
zinc y ácido clorhídrico.

Los grupos de bloqueo de amino se separan tratando  
el péptido o aminoácido protegido, con un ácido tal como  
ácido fórmico, ácido trifluoracético, (TFA), ácido p-toluen-  
15 sulfónico (TSA), ácido bencensulfónico (BSA) y ácido nafta-  
lensulfónico para formar la sal de adición del ácido respec-  
tivo. La separación del grupo de bloqueo de amino, puede  
también lograrse mediante el tratamiento del péptido o ami-  
noácido bloqueado con una mezcla de HBr o HCl y ácido acéti-  
20 co para producir la sal de adición del ácido clorhídrico o  
del ácido bromhídrico correspondiente. El reactivo o método  
particular que se emplee dependerá de las características  
químicas o físicas de los productos implicados en la reac-  
ción de desbloqueo específica. Se ha descubierto, en los  
25 casos en que el grupo  $R_4$  es diferente a hidrógeno y se va a  
desbloquear un péptido que contiene por lo menos tres restos  
aminoácido, que es altamente preferible que el péptido se  
desbloquee con ácido trifluoracético o ácido fórmico, para  
producir la sal de adición del ácido correspondiente. La  
30 sal puede convertirse a una forma más farmacéuticamente acep-

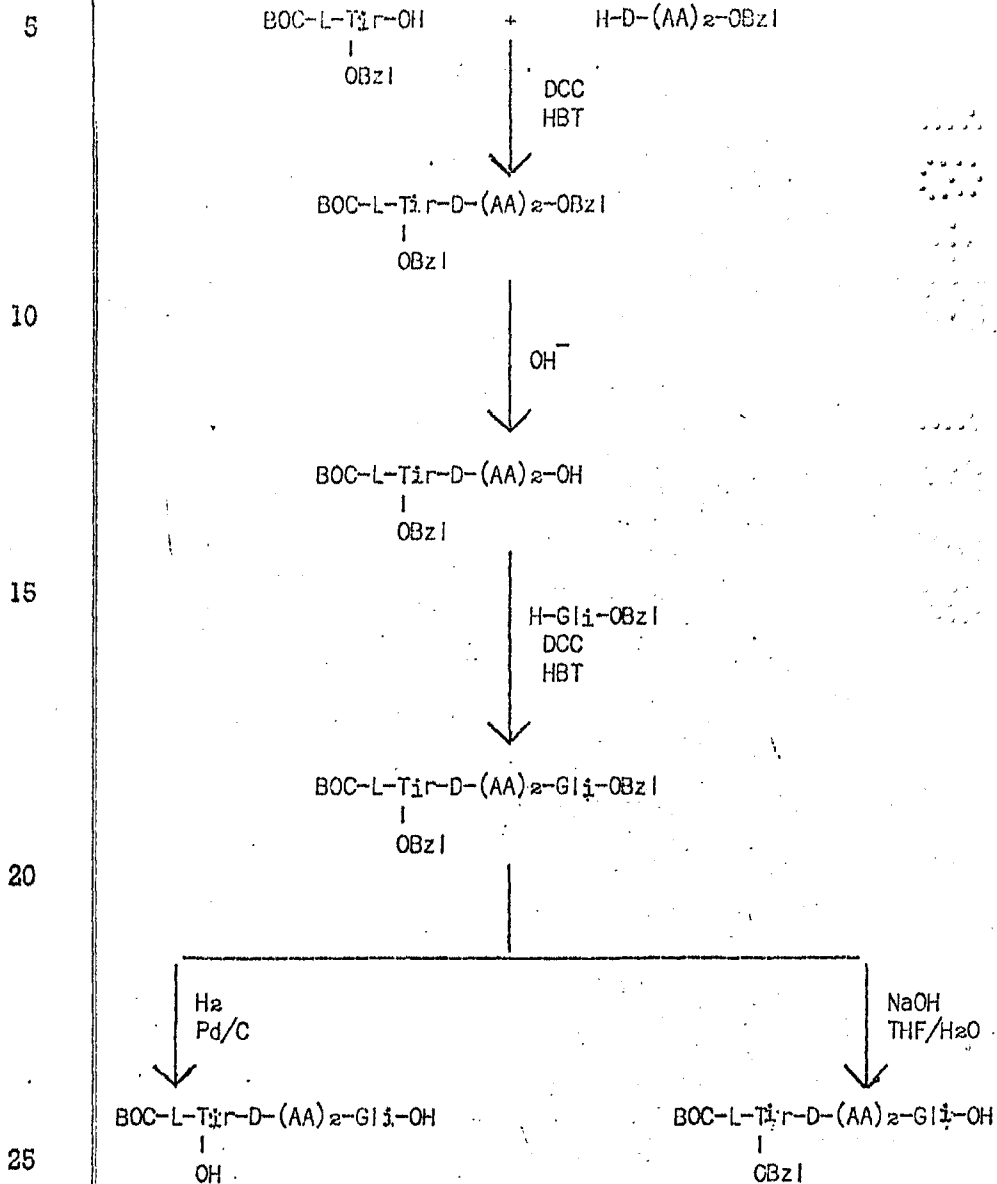
1 table mediante tratamiento con una resina de intercambio de  
iones adecuada, tal como DEAE Sephadex A25, y Amberlyst A27.

5 El grupo de protección de hidroxilo presente en el  
resto tirosilo puede mantenerse en el péptido durante la  
secuencia de su preparación, separándose durante la etapa  
sintética final, junto con el grupo de bloqueo de amino.  
Sin embargo, dependiendo de las condiciones empleadas para  
la separación del grupo de bloqueo de carboxilo, puede se-  
pararse antes en la secuencia de preparación. Cuando el gru-  
10 po carboxilo se separa mediante saponificación alcalina, se  
mantiene el grupo de protección de hidroxilo; sin embargo,  
cuando se emplea una hidrogenólisis catalítica para la se-  
paración del grupo de protección de carboxilo, se separa  
también el grupo de protección hidroxilo. La última situación  
15 no representa un problema serio, ya que la preparación de  
los compuestos de la fórmula (I) puede lograrse en presencia  
de un resto de tirosilo que tiene un grupo hidroxilo libre.

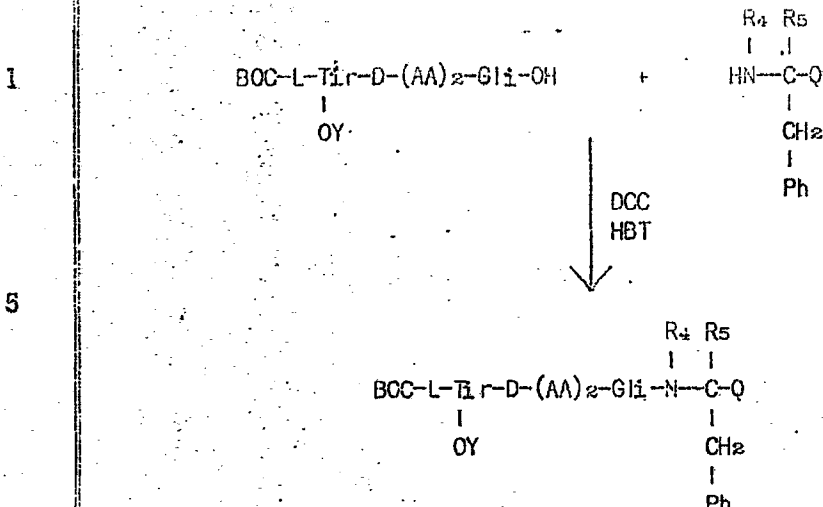
20 Un método específico preferido para preparar los  
compuestos de fórmula (I), implica copular un tripéptido  
N-terminal preparado separadamente con una fenilalanilamida  
C-terminal preparada separadamente (Z es  $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{NH}_2$ ) o su al-  
cohol correspondiente (Z es  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) o nitrilo (Z es  $-\text{CN}$ ) se-  
guido por un desbloqueo apropiado de cualesquiera porciones  
bloqueadas restantes. Alternativamente, el compuesto de  
25 fenilalanila C-terminal preparado separadamente, que se hace  
reaccionar con el tripéptido N-terminal, puede estructurarse  
de modo que contenga un grupo que represente un precursor  
de cualquiera de las porciones de amida, alcohol o nitrilo.  
La secuencia general, ilustrativa de la preparación de un  
30 tetrapéptido de fórmula (I), puede representarse como sigue.

1 En la secuencia, el símbolo AA representa el resto de amino-  
ácido, y el número anexo representa la posición del aminoá-  
cido en la secuencia del producto del péptido final.

5 A. Preparación del segmento de tripéptido.



B. Acoplamiento de la porción de fenilalanilo ter-  
minal y tripéptido.



10 En la reacción anterior, F representa fenilo y Q es  $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{COCH}_3$ ,  $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OCH}_2\text{F}$ , y otros grupos similares.

15 Cuando Q es  $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OCH}_3$ ,  $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OCH}_2\text{F}$  y otros grupos de éster similares, puede convertirse, después de la acoplación en  $-\text{CH}_2\text{OH}$  mediante tratamiento con  $\text{NaBH}_4$ . Esta técnica de reducción se describe en Yamamura y otros, Patente de los Estados Unidos No. 3.700.651. Cuando Q representa un éster bencílico u otro éster que comprende un grupo que es fácilmente separable mediante hidrogenólisis, puede convertirse en el ácido libre mediante hidrogenólisis en presencia de

20 paladio sobre carbón. El ácido libre se puede convertir en la amida mediante tratamiento con amoníaco, en presencia de DCC y HBT.

25 La porción de amida puede deshidratarse al nitrilo, mediante tratamiento con cloruro de p-toluensulfonilo y piridina, de conformidad con el método descrito en Yamada y otros, Bull, of the Chem.Soc. de Japón, 50, 1088-1093 (1977)

30 En la preparación de los compuesto de fórmula (I), mediante las secuencias descritas con anterioridad; es altamente preferido emplear, como reactivo C-terminal, un compuesto que contenga el grupo Z del producto final pretendido.

Una vez que se ha preparado el tetrapeptido modifi-

1 cado pretendido con el grupo C-terminal, el grupo O-protector en el tirosilo (si está presente) puede separarse mediante hidrogenólisis, y el grupo protector N-BOC mediante tratamiento con ácido trifluoroacético.

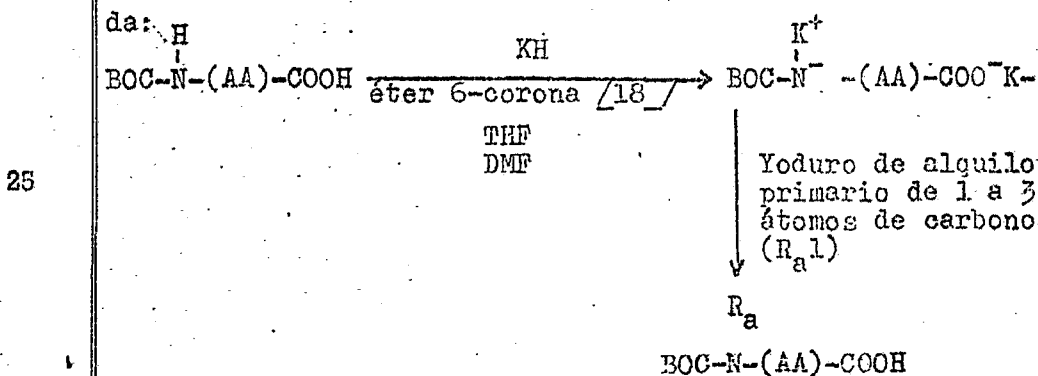
5 Lo anterior representa únicamente una secuencia para preparar los compuestos de fórmula (I). Son posibles otras secuencias. Otro método que puede emplearse implica la adición secuencial, en etapas, de los aminoácidos individuales o sus derivados, en la construcción de la cadena peptídica empezando con la porción terminal de carboxamida, de alcohol o de nitrilo. Se emplearán técnicas de reacción  
10 tales como las descritas anteriormente, en esta secuencia de preparación contemplada, así como también en cualquier otra.

15 Un método adicional para preparar los compuestos de la fórmula (I) es la síntesis en fase sólida. En este método, el resto C-terminal se une a un soporte polimérico adecuado; y el péptido se alarga un resto cada vez hasta que se sintetiza el péptido deseado, unido aún al soporte del polímero. Se prepara después el péptido del soporte mediante el empleo de un reactivo de desbloqueo adecuado. Por ejemplo, la porción C-terminal, protegida en el  $\alpha$ -amino por el grupo t-butiloxicarbonilo, se copula a un polímero de benzhidrilamina mediante activación con DCC. El grupo N-BOC se separa  
20 mediante la reacción del resto de polímero unido con ácido trifluoroacético en cloruro de metileno. La sal resultante se neutraliza con una amina terciaria adecuada, y la secuencia se repite añadir a cada aminoácido sucesivo. Al término de la preparación de la secuencia de péptidos pretendida, el  
25 péptido bloqueado se separa del soporte polimérico mediante  
30

1 tratamiento con HF a 0°C. El producto puede entonces purificarse por cromatografía. Las condiciones específicas de la síntesis, es decir, los tiempos de reacción, las temperaturas de reacción, los tiempos de lavado, los reactivos, los grupos de protección, y similares, son bien conocidos por las personas con experiencia ordinaria en la técnica de la síntesis de los péptidos en fase sólida.

5 La separación del péptido del soporte provoca simultáneamente la separación de todos los grupo de bloqueo con la formación del intermediario tetrapéptico. Ya que es altamente deseable mantener dichos grupos de protección en la conversión del producto al compuesto de nitrilo, la síntesis en fase sólida no es un método deseable para preparar los compuestos de fórmula (I) en donde Z es-CN.

10 En algunos de los compuestos de fórmula (I), uno o más de los grupos R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>4</sub> son alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono. En estos casos, el aminoácido N-sustituido apropiado se emplea en la secuencia de preparación. Cualquiera de los aminoácidos N-monosustituidos puede prepararse mediante la misma secuencia que se muestra a continuación, utilizando un aminoácido N-protegido como producto de parti-



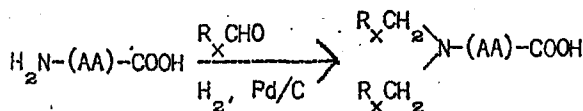
30 Como se indica en la secuencia anterior, el aminoácido N- $\alpha$ -protegido, se trata primero con hidruro de pota-

1 sio en presencia de un éter corona adecuado para generar di-  
anión. El intermediario se trata entonces con el yoduro de  
alquilo apropiado para obtener el aminoácido N-sustituido  
deseado.

5 Será evidente para aquellos con una experiencia or-  
dinaria en la técnica de la síntesis de los péptidos que  
puede ocurrir la racemización en el carbono  $\alpha$  en condiciones  
fuertemente alcalinas, tales como las empleadas en el proce-  
dimiento de alquilación anterior. El grado de racemización  
10 puede variar dependiendo del compuesto amino particular im-  
plicado. La racemización puede minimizarse utilizando un  
agente de alquilación en exceso y haciendo que el tiempo de  
reacción sea lo más corto posible. Independientemente, aún  
en el caso de que ocurra una racemización excesiva, el pro-  
15 ducto puede purificarse mediante recristalización como sal  
de una amina quiral adecuada, por ejemplo como la sal  $d(+)\alpha$ -  
feniletilamina.

El aminoácido resultante en donde  $R_4$  es alquilo  
primario de 1 a 3 átomos de carbono, puede convertirse en su  
20 amida, alcohol o nitrilo correspondiente, mediante cualquiera  
de las técnicas descritas en la presente con anterioridad.

En los casos, en los que tanto  $R_1$  como  $R_2$  son el  
mismo alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono, la tiro-  
sina N,N-disustituida deseada puede prepararse mediante la  
25 siguiente secuencia:



30 En la anterior,  $R_x\text{CHO}$  representa formaldehído, acetaldehído  
ó propionaldehído.

1           En los casos donde  $R_1$  y  $R_2$  son grupos alquilo prima-  
rios de 1 a 3 átomos de carbono, la tirosina N,N-disustitui-  
da es asequible mediante tratamiento de la tirosina N-mono-  
5           sustituida apropiada, preparada de conformidad con la secuen-  
cia anterior con formaldehído o acetaldehído, como se des-  
cribió en la presente con anterioridad.

10           En algunos de los compuestos de fórmula (I), el  
grupo  $R_5$  es alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono. En  
estos casos, se emplea en las secuencias de preparación, el  
aminoácido sustituido en el carbono  $\alpha$  apropiado o su deriva-  
do correspondiente de éster, amida, alcohol o nitrilo. La  
fenilalanina sustituida en el carbono  $\alpha$  particular, puede pre-  
pararse utilizando el método descrito por Stein y otros,  
15           Journal of the American Chemical Society, Vol. 77, 700-703  
(1955). La resolución de la mezcla racémica se efectúa de  
conformidad con Turk y Otros, J. Org. Chem. Vol. 40, No. 7,  
953-955 (1975). La fenilalanina  $\alpha$ -sustituida resultante, pue-  
de convertirse en la amida, alcohol o nitrilo correspondien-  
te, de conformidad con los métodos descritos en la presente  
20           con anterioridad. Esto puede realizarse ya sea antes o des-  
pués de que se ha utilizado en la preparación de la secuen-  
cia de tetrapéptido; sin embargo, es altamente preferido  
que esto se haga antes de la preparación de tetrapéptido.

25           Los compuestos de fórmula (I) donde Y es acetilo,  
se preparan a partir del péptido correspondiente en donde Y  
es hidrógeno y el grupo amino terminal se bloquea adecuada-  
mente. Este último compuesto se trata con anhídrido acético  
en presencia de piridina para producir el O-acetilpéptido  
N-bloqueado correspondiente. Al desbloquear con una mezcla  
30           de ácido clorhídrico y ácido acético, se obtiene el compues-

1 to deseado.

5 Los compuestos de fórmula (I) son agentes farmacéuticos valiosos. Exhiben actividad analgésica y son especialmente útiles para la administración parenteral a mamíferos, incluyendo los seres humanos.

10 Los compuestos de fórmula (I), pueden administrarse como tales, o pueden mezclarse y formularse a preparaciones farmacéuticas en forma de dosis unitaria para administración parenteral. En el mezclado o formulación pueden emplearse líquidos y/o sólidos orgánicos o inorgánicos que son vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichos vehículos adecuados serán bien conocidos por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica. Las composiciones pueden tomar la forma de tabletas, gránulos de polvo, cápsulas, suspensiones, 15 soluciones y similares.

20 Los compuestos de fórmula (I) cuando se administran en una cantidad efectiva producen un efecto analgésico. Los niveles de dosis pueden variar generalmente de 0,1 mg a 100 mg aproximadamente por kg de peso del cuerpo del receptor. La escala de dosis preferida es de 1,0 mg a 20 mg aproximadamente por kg. de peso del cuerpo del receptor.

25 Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar la preparación y la actividad de los compuestos de fórmula (I). No se pretende que sean limitativos en cuanto a su alcance.

Ejemplo 1

Preparación de la sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-N<sup>α</sup>-metil-L-fenilalanilamida.

A. p-Toluensulfonato de D-alinato de bencilo.

30 A una mezcla de 100 ml de alcohol bencílico y 200

1 ml de benceno que contienen 55,1 g. (0,29 moles) de monohi-  
drato de ácido p-toluensulfónico, se agregaron 25 g. (0,281  
moles) de D-alanina. La mezcla se puso a reflujo y se separó  
5 azeotrópicamente el agua en un aparato de Dean-Stark. La  
mezcla se calentó durante quince horas y después se enfrió  
a temperatura ambiente y se diluyó con éter. El precipitado  
resultante se recogió y se recrystalizó en metanol-éter para  
producir 55,3 g (56%) del compuesto del título, p.f. 112-  
115°C.

10 Análisis calculado para  $C_{17}H_{21}NO_5$  (351,42):

C, 48,10; H, 6,02; N, 3,99.

Encontrado C, 58,19; H, 6,06; N, 3,82.

B. N<sup>α</sup>-t-butiloxycarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-ali-  
nato de bencilo.

15 A 200 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) seca, se  
agregaron 35,1 g. (0,1 moles) del producto de la parte A. La  
mezcla resultante se agitó y se enfrió a 0°C., y se agrega-  
ron 11,2 g. (0,1 moles) de diazabicyclooctano (DABCO). La  
mezcla se agitó durante diez minutos a 0°C, y se agregaron  
20 37,1 g. (0,1 moles) de N<sup>α</sup>-t-butiloxycarbonil-O-bencil-L-  
tirosina, seguidos por 13,5 g. (0,1 moles) de 1-hidroxiben-  
zotriazol (HBT) y 20,6 g. (0,1 moles) de N,N'-díciclohexilcar-  
bodimida (DCC). La mezcla resultante se agitó a 0°C durante  
3 horas y, después, a temperatura ambiente durante 24 horas.  
25 La mezcla se enfrió entonces a 0°C, la suspensión resultante  
se filtró, y el filtrado se concentró a vacío. El residuo  
resultante se redisolvió después en acetato de etilo y se  
lavó sucesivamente con NaHCO<sub>3</sub> 1N agua, ácido cítrico frío  
0,75 N y agua. La capa orgánica se secó, después, sobre sul-  
fato de magnesio, se filtró y se concentró a vacío. El resi-  
30

1      duo resultante se disolvió después en etanol caliente. Al  
enfriar se produjo la cristalización. Después de una recris-  
talización en etanol, se obtuvieron 41,5 g (80%) del compues-  
to del título puro, p.f. 121-123°C.

5      Análisis, calcula para  $C_{30}H_{36}N_2O_6$  (520,63):

          C, 69,21; H, 6,97; N, 5,38

Encontrado:   C, 68,99; H, 6,75; N, 5,17.

          C. N<sup>o</sup> -t-butiloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-  
          alanina.

10           A una mezcla de 200 ml. de tetrahidrofurano (THF)  
y 20 ml de agua, se agregaron 31,2 g. (0,06 moles) del pro-  
ducto de la parte B. La solución resultante se enfrió a 0°C.  
y se agregaron lentamente 13,2 ml (1,1 equivalentes) de hi-  
dróxido de sodio 5 N. La mezcla resultante se agitó y se  
15      dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente. Des-  
pués de 5 horas, la mezcla se extrajo entre agua y éter. La  
capa acuosa se separó y se enfrió, el pH se ajustó a 2 por  
adición de ácido cítrico, y la mezcla se extrajo con acetato  
de etilo. El extracto de acetato de etilo se lavó con agua,  
20      se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se diluyó  
con éter. El precipitado resultante se recogió para producir  
17,7 g. (67%) del compuesto del título, p.f. 160-162°C.

          Análisis, calcula para  $C_{24}H_{30}N_2O_6$  (442,51):

          C, 65,14; H, 6,83; N, 6,63.

25      Encontrado:   C, 64,74; H, 6,70; N, 6,20.

          D. N<sup>o</sup> -t-butiloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-alanilglici-  
          nato de bencilo.

          A 70 ml. de dimetilformamida seca se agregaron 6,74  
g. (0,02 moles) de la sal de glicinato de bencilo del ácido  
30      p-toluensulfónico. La mezcla resultante se enfrió a 0°C., y

1 se agregaron 2,24 g. (0,020 moles) de DABCO. La mezcla se  
agitó durante unos cuantos minutos y se agregaron 8,84 g.  
(0,020 moles) del producto de la parte C, seguidos por 2,7 g.  
5 (0,020 moles) de HBT y 4,12 g (0,020 moles) de DCC. La mez-  
cla de reacción se agitó durante 2 horas a 0°C. y después  
durante 24 horas a temperatura ambiente. La suspensión re-  
sultante se enfrió a 0°C. se filtró, y el filtrado se con-  
centró a vacío. El residuo resultante se disolvió en acetato  
de etilo y se lavó sucesivamente con bicarbonato de sodio  
10 1N, agua, ácido cítrico 0,75N, frío y agua. La fase orgánica  
se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró  
a vacío. El residuo resultante se cristalizó en etanol, para  
dar 10,8 g (92%) del compuesto del título puro, p.f. 145-147  
°C.

15 Análisis, calculado para  $C_{33}H_{39}N_3O_7$  (589,69):

C; 67,22; H, 6,67; N, 7,13.

Encontrado: C, 67,32; H, 6,83; N, 6,91.

E. N<sup>α</sup> -t-butiloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-  
alanilglicina.

20 A 150 ml de una mezcla de 9:1 de tetrahidrofurano  
y agua, se agregaron 15,95 g. (27 mmoles) del producto de la  
parte D. La mezcla se enfrió a 0°C. con agitación y se agre-  
garon gota a gota 30 ml de hidróxido de sodio 1N, a la mez-  
cla resultante. La mezcla se agitó durante 2 horas hasta el  
25 término de la adición gota a gota, y después se extrajo dos  
veces con éter. La capa acuosa separada se aciduló a un pH  
de 2,5 por adición de 30 ml de ácido clorhídrico 1N. El com-  
puesto del título cristalizó, se recogió por filtración y se  
recristalizó una vez en una mezcla de metanol y agua, y dos  
30 veces en acetato de etilo para dar 11,43 g. (85% del teóri-

1 co), p.f. 104-107°C.  $[\alpha]_D^{25} +31,4^\circ$  (C=0,5, MeOH).

Análisis, calculado para  $C_{26}H_{33}N_3O_7$  (499,54):

C, 62,51; H, 6,66; N, 8,41.

Encontrado. C, 62,31; H, 6,83; N, 8,12.

5 F. Sal de d-(+)  $\alpha$ -metilbencilamina de la N <sup>$\alpha$</sup> -t-butiloxicarbonil-N <sup>$\alpha$</sup> -metil-L-fenilalanina.

A 75 ml de tetrahidrofurano, se agregaron 13,26 g. (0,05 moles) de N <sup>$\alpha$</sup> -t-butiloxicarbonil-L-fenilalanina. La mezcla resultante se agregó gota a gota durante un período de 30 minutos a una suspensión agitada mecánicamente de 0,15 moles de hidruro de potasio y 0,5 g de éter 6-corona- $[\underline{18}]$  a 0°C., a una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante una hora más a 0°C. Se agregó gota a gota, durante un período de 15 minutos, una solución de 6,23 ml. (0,1 moles) de yoduro de metilo en 15 ml de tetrahidrofurano. La mezcla se mantuvo durante 2 horas y se agregó, gota a gota, una mezcla de 10 ml de ácido acético y 10 ml de tetrahidrofurano, seguidos por 20 ml de etanol. La mezcla se vertió, después, sobre 400 ml de hielo. El pH de la fase acuosa resultante se elevó entonces a 12-13, por adición de hidróxido de sodio 2N. La mezcla acuosa se extrajo dos veces con éter, y después se aciduló a un pH de 3,0 por adición de ácido cítrico sólido. La mezcla acuosa se extrajo después tres veces con 200 ml. de éter. Los extractos etéreos se combinaron, se extrajeron con agua, se secaron sobre sulfato de magnesio, y se evaporaron a vacío para dar un jarabe. El jarabe se disolvió en 50 ml. de éter y se agregaron 6,44 ml (0,05 moles) de d-(+)  $\alpha$ -metilbencilamina. La solución resultante se diluyó con 350 ml de hexano y se rascó. El producto se recogió por filtración para dar 15,83 g. (79% del

1 teórico) del compuesto del título. La recristalización en acetato de etilo, dió 13,70 g. (68% del teórico) del compuesto del título, p.f. 136-139°C  $[\alpha]_D^{25}$  -28,2° (C = 1, EtOH).

5 Análisis, calculado para  $C_{23}H_{32}N_2O_4$  (400,50):

C, 68,97; H, 8,05; N, 6,99.

Encontrado: C, 68,75; H, 7,81; N, 6,74.

G. N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-N<sup>α</sup>-metil-L-fenilalanil-amida.

10 Se disolvió N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-N<sup>α</sup>-metil-L-fenilalanina (4,0 g; 0,01 moles; preparada por acidulación de la sal d(+)-α-metilbencilamina y extracción con éter), en 20 ml de N,N-dimetilformamida (DMF). La mezcla se enfrió a -15°C., y se agregaron 1,56 ml. (0,012 moles) de cloroformiato de isobutilo, seguidos por 1,32 ml. (0,012 moles) de

15 N-metilmorfolina. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a -15°C., y se burbujeó amoníaco anhidro a la mezcla de reacción durante 1,5 horas. La mezcla resultante se agitó durante una hora a -15°C., y la mezcla se vertió después en

20 un recipiente que contenía 200 ml de hielo. La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se separó y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 1,5 N, agua, bicarbonato de sodio 1N, y agua. La solución de acetato de etilo se secó después sobre sulfato de magnesio y se evaporó

25 a vacío para dar un jarabe que cristalizó en una mezcla de éter y éter de petróleo, dando 2,12 g. (76% del teórico) del compuesto del título, p.f. 91-92°C.  $[\alpha]_D^{25}$  -111,2° (C=0,5, CHCl<sub>3</sub>).

30 Análisis, calculado para  $C_{15}H_{22}N_2O_3$  (278,33):

C, 64,73; H, 7,97; N, 10,06

Encontrado: C, 64,95; H, 7,81; N, 9,79.

1 H. N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-  
alanil-glicil-N<sup>α</sup>-metil-L-fenilalanil amida.

5 A 20 ml de ácido acético glacial recientemente pre-  
parado que contenía ácido clorhídrico anhidro (1N) y 2 ml.  
de anisol, se agregaron 1,95 g. (0,007 moles) de N<sup>α</sup>-t-butil-  
oxicarbonil-N<sup>α</sup>-metil-L-fenilalanilamida. La mezcla resul-  
tante se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

10 La mezcla se vertió después en éter, y el precipitado resul-  
tante se recogió y se secó (1,5 g.). Se disolvió después la  
sal clorhidrato en 30 ml de dimetilformamida. La solución se  
enfrió a 0°C., y se agregaron 1,4 ml (0,007 moles) de dici-  
clohexilamina. La mezcla se agitó durante unos cuantos minu-  
tos, y se agregaron 3,5 g. (0,007 moles) de N<sup>α</sup>-t-butiloxicar-

15 bonil-O-bencil-L-tirosil-D-alanil-glicina, 950 mg. (0,007  
moles) de HBT, y 1,4 g (0,007 moles) de DCC. La mezcla de  
reacción se agitó entonces a 0°C. durante 2 horas, y después  
a 4°C. durante 24 horas. La mezcla se enfrió a 0°C y se fil-

20 tró. El filtrado se concentró a vacío para dar un aceite,  
el cual se redisolvió en acetato de etilo. La solución de  
acetato de etilo se extrajo sucesivamente con bicarbonato de  
sodio 1N, agua, ácido cítrico 0,75 N frío y agua. La fase  
orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a  
vacío, para dar un aceite. El aceite se cromatografió sobre

25 columna de 40 cm. x 3 cm. de gel de sílice de Grace y Davison  
Grado 62, en cloroformo. El producto se eluyó utilizando un  
gradiente en etapas de cloroformo a una mezcla de metanol  
al 10% en cloroformo. El producto se aisló de conformidad  
con el perfil de la cape fina de las fracciones recogidas  
para dar 3,55 g. (77% del teórico) del compuesto del título.

30  $[\alpha]_D^{25} -9,2$  (C = 0,5, MeOH).

1 Análisis, calculado para  $C_{36}H_{45}N_5O_7$  (659,8):  
C, 65,54; H, 6,57; N, 10,61  
Encontrado: C 65,46; H, 6,58; N, 10,36.

5 I.  $N^\alpha$ -t-butiloxicarbonil-L-tirosil-D-alanil-glicil-  
 $N^\alpha$ -metil-L-fenilalanilamida.

10 El producto de la parte H (3,2 g; 0,0485 moles) se  
disolvió en 60 ml de etanol y se agregaron 1,5 g. de paladio  
sobre carbón al 5% a la mezcla, como una suspensión en agua.  
Se burbujeó nitrógeno a la mezcla de reacción a través de un  
15 tubo de dispersión de gas, durante aproximadamente 5 minutos,  
seguido por gas hidrógeno durante 6 horas. La mezcla de reac-  
ción se inundó después con nitrógeno y el catalizador de pa-  
ladio se separó mediante filtración. La mezcla se concentró  
a vacío para dar un jarabe. El jarabe se disolvió en cloro-  
20 formo y se adsorbió en una columna cromatográfica de 40 cm.  
x 3 cm., que contenía gel de sílice de Grace y Davison Grado  
62. El producto se eluyó utilizando un gradiente en etapas  
de cloroformo a metanol al 10% en cloroformo y se aisló de  
conformidad con el perfil de la capa fina de las fracciones  
recogidas para dar 2,0 g. (74% del teórico).  $[\alpha]_D^{25} -9,9^\circ$   
(C = 0,5, MeOH).

Análisis de aminoácidos, Encontrado: Gli, 1,01;  
Ala 0,99, Tir, 0,99;  $NH_3$ , 1,14.

25 J. Sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-N  
metil-L-fenilalanilamida.

30 Se disolvió el producto de la parte I (1,6 g;  
0,00281 moles) en 10 ml de ácido trifluoracético que contiene  
0,5 ml de anisol. La mezcla se agitó a 0°C. durante 30 mi-  
nutos. La mezcla se vertió después en éter y el precipitado  
resultante se recogió y se secó (1,1 g.). El sólido se disol-

1 vió después en éter y el precipitado resultante se recogió  
y se secó (1,1 g.). El sólido se disolvió en suficiente so-  
lución tampón acuosa (1% de piridina y 0,05% de ácido acéti-  
co) hasta 15 ml., y la solución se aplicó a una columna de  
5 2,5 cm x 99 cm. de DEAE-Sephadex A 25 (acetato) que se había  
equilibrado con el mismo tampón. El eluato se revisó a 280  
nm y las fracciones apropiadas se combinaron y se liofili-  
zaron. La reiofilización de ácido acético al 10%, seguida  
por liofilización de una mezcla de 75:25 de agua y acetoni-  
trilo, dió 0,84 g del compuesto del título.  $[\alpha]_D^{25} + 27,8^{\circ}$   
10 (C = 1, 1N HCl).

Análisis de aminoácido, encontrado: Tir, 0,98; Ala  
1,03; Gli, 1,00; NH<sub>3</sub>, 1,05.

Ejemplo 2

15 Preparación de la sal acetato de L-tirosil-D-alanil-Glicil-  
L- $\alpha$ -metilfenilalanilamida.

A. Sal tosilato del éster bencílico de L- $\alpha$ -metil-  
fenilalanina.

20 A 100 ml de benceno, se agregaron 3,0 g. (0,0168  
moles) de L- $\alpha$ -metilfenilalanina. A la suspensión resultante  
se agregaron después 3,5 g. (1,1 equivalente) de hidrato de  
ácido p-toluensulfónico y 10 ml de alcohol bencílico. La  
mezcla se puso a reflujo en presencia de una trampa de agua  
de Dean-Stark durante cuatro días. La mezcla se enfrió des-  
25 pués a temperatura ambiente y se agregó para precipitar la  
sal tosilato. El precipitado resultante se recogió y se secó  
para dar 7,0 g. (95%) del compuesto del título, p.f. 129-  
131°C  $[\alpha]_D^{25} - 10,7$  (C=0,5, MeOH 1N).

Análisis, Calculado para C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>S (441,5):

30 N, 3,17.

Encontrado: N, 2,87.

1 B. Ester bencílico de N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-alanil-glicil-L-α-metilfenilalanina.

5 A 80 ml de DMF se agregaron 5,74 G. (0,013 mmoles) del producto de la Parte A. La mezcla resultante se enfrió a 0°C. durante 5 minutos y se agregaron 6,5 g (13 mmoles) de N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-9-bencil-L-tirosil-D-alanil-glicina (preparada como en el ejemplo 1), 1,8 g. (13 mmoles) de HBT, y 2,7 g. (13 mmoles) de DCC. La mezcla se agitó a 0°C. durante dos horas y después a temperatura ambiente durante 24 10 horas. La mezcla se enfrió después a 0°C y el precipitado resultado se separó por filtración. El filtrado se evaporó a vacío. El residuo resultante se disolvió en acetato de etilo y la solución de acetato de etilo se extrajo sucesivamente con bicarbonato de sodio 1N, agua, ácido cítrico 0,75N y 15 agua. La fase orgánica se secó después sobre sulfato de magnesio y se evaporó a vacío para dar un aceite. El aceite se cristalizó en éter y se recrystalizó en una mezcla de acetato de etilo y éter para dar 7,0 g (72% del compuesto del título  $[\alpha]_D^{25} + 7,9^\circ$  (C = 0,5, MeOH).

20 Análisis calculado para C<sub>43</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> (750,86):

C, 68,78; H, 6,71; N, 7,46.

Encontrado: C, 68,75; H, 6,46; N, 7,21

25 C. Sal dicitclohexilamina de N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-L-tirosil-D-alanil-glicil-L-α-metilfenilalanina.

30 A 50 ml de etanol, se agregaron 4,0 g. (0,0053 moles) del producto de la parte B. Se agregó entonces una suspensión de 2,0 g. de paladio sobre cargón al 5% en DMF. Se burbujeó nitrógeno a la mezcla a través de un tubo de dispersión de gas durante 5 minutos, seguido por gas hidrógeno durante 4 horas. La mezcla se inundó después con nitrógeno

1 y el catalizador de paladio se separó por filtración. El fil-  
trado se concentró a vacío para dar un jarabe. El jarabe en  
cloroformo se aplicó a una columna de 10 cm x 2 cm. que con-  
tenía gel de sílice de Grace y Davison Grado 62. La columna  
5 se eluyó con un gradiente en etapas de cloroformo cloro-  
formo-metanol (9,5:0,5). Se combinaron las fracciones mayo-  
res y el disolvente se evaporó. El aceite resultante se di-  
solvió en acetato de etilo y se agregó 1 ml de dicitclohexil-  
amina. El precipitado resultante se recogió y se secó para  
10 dar 2,6 g. (65%) del compuesto del título, p.f. 142-146°C.  
 $[\alpha]_D^{25} + 46,3^\circ$  (C = 0,5, MeOH).

D. N<sup>α</sup> -t-butiloxicarbonil-L-tirosil-D-alanil-glicil-  
L-α-metilfenilalanilamida.

Se neutralizó el producto de la Parte C (2,0 g;  
15 0,0027 moles) con una mezcla de acetato de etilo y ácido  
cítrico 0,75 N. La capa orgánica resultante se separó, se  
extrajo con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se  
evaporó a vacío para dar un aceite (1,5 g). El ácido libre  
resultante se disolvió en 30 ml de DMF y la solución se en-  
20 frió a 0°C. en una botella a presión. Se agregó DCC (560 mg;  
0,0027 moles) y la mezcla se agitó durante 4 horas a 0°C.,  
y después durante 3 horas a temperatura ambiente. La botella  
se enfrió entonces a -78°C y se agregaron 30 ml de amoniaco  
anhidro. La botella se selló nuevamente y la mezcla se dejó  
25 agitando a temperatura ambiente durante 48 horas. La mezcla  
se enfrió a -78°C, la botella se abrió y se dejó evaporar  
el amoniaco a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó  
después a vacío. El residuo resultante se disolvió en aceta-  
to de etilo y la solución de acetato de etilo se extrajo pri-  
30 mero con ácido cítrico 0,75 N y después con agua. La solu-

1 ción se secó sobre sulfato de magnesio y el disolvente se  
evaporó a vacío. El residuo se disolvió en cloroformo y se  
aplicó a una columna de 3 cm por 45 cm de gel de sílice de  
Grace and Davison Grado 62. La columna se eluyó con un gra-  
5 diente en etapas que comprendía cloroformo → cloroformo:meta-  
nol (9:1). Las fracciones se combinaron en base al perfil  
de la cromatografía en capa fina, para dar, después de la  
evaporación del disolvente 1,1 g. (72%) del compuesto del  
título  $[\alpha]_D^{25} -26^\circ$  (C = 0,4 MeOH).

10 Análisis de aminoácidos Encontrado: Gli, 0,99; Ala,  
1,00; Tir, 0,99; NH<sub>3</sub>, 1,12.

E. Sal de acetato de L-tirosil-D-alanil-Glicil-L-α  
-metil-fenilalanilamida.

15 A 20 ml de una mezcla de ácido clorhídrico gaseoso  
1N en ácido acético glacial que contenía 0,3 ml de anisol,  
se agregaron 900 mg. (0,0016 moles) del producto de la Parte  
D. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 mi-  
nutos y después se vertió en éter. El precipitado resultan-  
te se recogió y se secó (720 mg). El sólido se disolvió en  
20 suficiente solución tampón acuosa (1% de piridina y 0,05%  
de ácido acético) para lograr un volumen de 5 ml y la solu-  
ción se aplicó a una columna de 2,5 cm x 99 cm de DEAE-Sepha-  
dex A-25 (acetato) previamente equilibrada con el mismo tam-  
pón. Se revisó el eluato a 280 nm y las fracciones apropia-  
25 das se combinaron y se liofilizaron. La re-liofilización de  
ácido acético al 10%, seguida por la liofilización de una  
mezcla de 75:25 de agua y acetonitrilo dió 400 mg del com-  
puesto del título  $[\alpha]_D^{25} + 23,9^\circ$  (C = 0,5 HCl 1N).

30 Análisis, calculado para C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (529,60):

C, 58,97; H, 6,66; N, 13,22; O, 21,15

Encontrado: C, 59,02; H, 6,36; N, 12,99; O, 21,41.

1 Análisis de aminoácidos, Encontrado: Tir, 0,96;  
Ala, 1,01; Gli, 1,00;  $\text{NH}_3$ , 1,03.

Ejemplo 3

5 Preparación de la sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-  
 $\text{N}^\alpha$ -n-propil-L-fenilalanilamida.

A-  $\text{N}^\alpha$ -t-butiloxicarbonil- $\text{N}^\alpha$ -n-propil-L-fenil-  
alanina.

10 A 70 ml de tetrahidrofurano se agregaron 10,6 g  
(0,04 moles) de  $\text{N}^\alpha$ -t-butiloxicarbonil-L-fenilalanina. La  
mezcla resultante se agregó gota a gota, durante un periodo  
de 30 minutos, a una suspensión mecánicamente agitada de  
0,12 moles de hidruro de potasio en 220 ml de tetrahidrofu-  
rano y 0,5 g. de éter-6-corona [18] a  $0^\circ\text{C}$ , en atmósfera de  
15 nitrógeno. La mezcla se agitó durante 10 minutos más a  $0^\circ\text{C}$ .  
Se agregó una solución de 23,3 ml (0,24 moles) de 1-yodopro-  
pano en 40 ml de tetrahidrofurano. La mezcla se mantuvo du-  
rante 2,5 horas a  $0^\circ\text{C}$  y se agregaron, gota a gota, a la mez-  
cla otros 6,5 ml (0,12 moles) de 1-yodopropano. La mezcla se  
20 agitó dos horas más a  $0^\circ\text{C}$ , se agregaron 10 ml de ácido  
acético glacial y la mezcla se agitó durante 10 minutos. La  
mezcla se vertió después en hielo triturado, el pH de la  
fase acuosa resultante se elevó entonces a 8,0 con hidróxido  
de sodio 2N. La mezcla acuosa se extrajo con éter y después  
se aciduló a un pH de 2,5 mediante la adición de ácido clor-  
25 hídrico 2N frío. La mezcla acuosa se extrajo después con  
acetato de etilo. El extracto de acetato de etilo se extrajo  
una vez con agua, se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se evaporó a vacío  
para dar un jarabe. El jarabe se disolvió en 200 ml de éter  
y se agregaron 8 ml (0,04 moles) de DCHA. El precipitado se  
30 filtró y el filtrado se extrajo una vez con ácido cítrico

1 1,5 N y agua. La capa etérea se secó (sobre  $MgSO_4$ ) y se eva-  
poró a vacío para dar un aceite. El aceite se cromatógrafió  
sobre una columna de 40 cm x 3 cm. de gel de sílice de Grace  
& Davison Grado 62, en cloroformo. El producto se eluyó uti-  
5 lizando un gradiente en etapas de cloroformo a una mezcla  
de metanol al 5% en cloroformo. El producto se aisló de con-  
formidad con el perfil en capa fina de las fracciones reco-  
gidas para dar 3,6 g. (31% del teórico) del compuesto del  
título  $[\alpha]_D^{25} - 153,3$  (C = 1, MeOH). RMN- $\delta$  ( $-CO_2H$ ) = 10,47 $\delta$   
10 ( $Me_2C-$ ) = 1,50.

Análisis, Calculado para  $C_{17}H_{25}NO_4$  (307,4):

C, 66,43; H, 8,20; N, 4,56

Encontrado: C, 66,16; H, 7,99; N, 4,45.

15 B.  $N^\alpha$ -t-butiloxicarbonil- $N^\alpha$ -n-propil-L-fenilala-  
nilamida.

Se disuelve la  $N^\alpha$ -t-butiloxicarbonil- $N^\alpha$ -n-propil-  
L-fenilalanina (preparada en la parte A) en N,N-dimetilfor-  
mamida (DMF). La mezcla se enfrió  $-15^\circ$  y se agregó un equiva-  
lente de cloroformiato de isobutilo, seguido por un equivalen-  
20 te de N-metilmorfolina. La mezcla se agitó durante 10 minu-  
tos a  $-15^\circ C$  y se burbujeó amoníaco anhidro a la mezcla du-  
rante 30 minutos. La mezcla resultante se agitó durante una  
hora a  $-15^\circ V$ . y se vertió después en un recipiente que con-  
tenía 200 ml de hielo. La solución acuosa se extrajo con  
25 acetato de etilo. La capa orgánica se separó y se lavó su-  
cesivamente con ácido cítrico 1,5 N, agua, bicarbonato de  
sodio 1N y agua. La solución de acetato de etilo se secó  
después (sobre  $MgSO_4$ ) y se evaporó a vacío para producir el  
compuesto del título.

30 C.  $N^\alpha$ -t-butiloxicarbonil-L-tirosil-D-alanil-gli-

1 cil-N<sup>α</sup>-n-propil-L-fenilalanilamida.

5 A 20 ml de ácido acético glacial recientemente pre-  
parado que contenía ácido clorhídrico anhidro (1N) y 2 ml.  
de anisal, se agregó un equivalente de N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbo-  
nil-N<sup>α</sup>-n-propil-L-fenilalanilamida. La mezcla resultante  
se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mez-  
cla se vertió después en éter y el precipitado resultante  
se recogió y se secó. La sal clorhidrato se disolvió después  
10 en 30 ml de DMF. La solución se enfrió a 0°C y se agregó un  
equivalente de dicitclohexilamina. La mezcla se agitó durante  
unos cuantos minutos y se agregaron un equivalente de N<sup>α</sup>-t-  
butiloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-D-alanil-glicina (prepa-  
rada como en el ejemplo 1E), un equivalente de HBT y un equi-  
valente de DCC. La mezcla de reacción se agitó a 0°C. duran-  
15 te 2 horas y después a 4°C. durante 24 horas. La mezcla se  
enfrió a 0°C., y se filtró. El filtrado se concentró a vacío  
para dar un aceite que se redisolvió en acetato de etilo.  
La solución de acetato de etilo se extrajo sucesivamente  
con bicarbonato de sodio 1N, aguam ácido cítrico 0,75N,  
20 frío y agua. La fase orgánica se secó sobre sulfato de mag-  
nesio y se concentró a vacío para dar un aceite. El aceite  
se cromatografió sobre una columna de 40 cm x 3 cm de Grace  
& Davison Grado 62, en cloroformo. El producto se eluyó uti-  
lizando un gradiente en etapas de cloroformo, a una mezcla de  
25 metanol al 10% en cloroformo. El producto se aisló de con-  
formidad con el perfil de la capa fina de las fracciones re-  
cogidas para dar N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-O-bencil-L-tirosil-  
D-alanil-glicil-N<sup>α</sup>-propil-L-fenilalanilamida.

30 El producto del párrafo anterior se disolvió en  
60 ml de etanol y se agregaron 1,5 g. de paladio sobre

POOR  
QUALITY

1 carbón al 5% a la mezcla, como una suspensión en agua. Se  
burbujeó nitrógeno a la mezcla de reacción a través de un  
tubo de dispersión de gas durante aproximadamente 5 minutos,  
seguido por gas hidrógeno durante 6 horas. La mezcla de reac-  
5 ción se inundó después con nitrógeno y se separó el catali-  
zador de paladio mediante filtración. La mezcla se concentró  
a vacío para dar un jarabe. El jarabe se disolvió en cloro-  
formo y se adsorbió en una columna cromatográfica de 40 cm x  
3 cm., que contenía gel de sílice de Grace & Davison Grado  
10 62. El producto se eluyó utilizando un gradiente en etapas  
de cloroformo a metanol al 10% en cloroformo y se aisló de  
conformidad con el perfil de la capa fina de las fracciones  
recogidas para producir el compuesto del título.  $[\alpha]_D^{25}$   
-34,8° (C = 0,5, MeOH).

15 Análisis, Calculado para  $C_{31}H_{43}N_5O_7$  (597,7):

C, 62,29; H, 7,25; N, 11,72.

Encontrado: C, 62,13; H, 6,24; N, 11,70.

D. Sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-N $\alpha$ -n-  
propil-L-fenilalanilamida.

20 El producto de la Parte C (800 mg; 1,34 mmoles) se  
disolvió en 10 ml de ácido trifluoracético que contenía 0,5  
ml de anisol. La mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos.  
La mezcla de reacción se liofilizó. El sólido se disolvió  
en suficiente solución tampón acuosa (1% de piridina y 0,05%  
25 de ácido acético) hasta 10 ml., y la solución se aplicó a  
una columna de 2,5 cm x 99 cm. de DEAE-Sephadex A-25 (aceta-  
to) que se había equilibrado con el mismo tampón. El eluato  
se revisó a 280 nm y se combinaron y liofilizaron las frac-  
ciones apropiadas. La re-liofilización del ácido acético 1M  
30 dió 655 mg. del compuesto del título  $[\alpha]_D^{25}$  -11,0° (C = 0,5

1 HCl 1 N).

Análisis, calculado para  $C_{28}H_{39}N_5O_7$  (557,6):

C, 60,31; H, 7,05; N, 12,56

Encontrado: C, 60,23; H, 6,98; N, 12,49.

5 Análisis de aminoácidos,

Encontrado: Tir, 0,99; Ala, 1,00; Gli, 1,01;

$NH_3$ , 0,96.

EJEMPLO 4

10 Preparación de la sal acetado de L-tirosil-D-alanil-  
-Glicil- $N^{\alpha}$ -Etil-L-Fenil-Alanilamida.

A.  $N^{\alpha}$ -butiloxycarbonil- $N^{\alpha}$ -etil-L-Fenilalanina.

A 70 ml. de tetrahidrofurano se agregaron 10,6 g. (0,04 moles) de  $N^{\alpha}$ -butiloxycarbonil-L-fenilalanina. La mezcla resultante se agregó gota a gota, durante un periodo de 15 30 minutos, a una suspensión mecánicamente agitada de 0,12 moles de hidruro de potasio en 220 ml. de tetrahidrofurano y 0,5 g. de éter 6-corona-187 a 0° C. en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 10 minutos más a 0° C. Se agregó gota a gota, durante un periodo de 20 minutos, una 20 solución de 19,4 ml. (0,24 moles) de yoduro de etilo en 40 ml. de tetrahidrofurano. La mezcla se mantuvo durante 4 horas a 0° C. Se agregaron otros 19,4 ml. (0,24 moles) de yoduro de etilo, en dos porciones iguales a la mezcla. La mezcla se agitó durante dos horas más a 0° C. y después se agregaron 25 10 ml. de ácido acético glacial. Después de agitar la mezcla durante 10 minutos, se vertió 400 ml. de hielo triturado. El pH de la fase acuosa resultante se elevó a un valor de 8,0 por adición de hidróxido de sodio 2 N. La mezcla acuosa se extrajo dos veces con éter, y después se aciduló a un pH de 30 2,5 por adición de ácido clorhídrico 2 N. La mezcla acuosa

1 se extrajo con acetato de etilo. El extracto se lavó con  
agua, se secó (sobre  $MgSO_4$ ) y se evaporó a vacío para dar un  
jarabe. El jarabe se disolvió en 200 ml. de éter y 8 ml.  
(0,04 moles) de DCHA. El precipitado se filtró y el filtrado  
5 se extrajo con ácido cítrico 1,5 N y agua. La capa etérea se  
secó (sobre  $MgSO_4$ ) y se evaporó a vacío para dar 4,6 g. (39  
% del teórico) del compuesto del título.  $RMN^{\delta}$  (fenilo) =  
7,25 ( $Me_3COC-$ ) = 1,4.

10 B.  $N^{\alpha}$ -t-butiloxicarbonil- $N^{\alpha}$ -etil-L-fenilalanilami-  
da.

Se disolvió  $N^{\alpha}$ -t-butiloxicarbonil- $N^{\alpha}$ -etil-L-fenil-  
alanina (4,3 g; 0,0146 moles; preparada en la parte A) en 60  
ml. de N, N-dimetilformamida (DMF). La mezcla se enfrió a  
0° C. y se agregaron 3,0 g. (0,0146 moles) de N, N'-diciclo-  
15 hexilcarbodiimida (DCC). La mezcla de reacción se agitó du-  
rante dos horas a 0° C. y después 72 horas a temperatura am-  
biente. La mezcla se enfrió después a 0° C. y se filtró. El  
filtrado se concentró a vacío para dar un aceite que se redi-  
solvió en acetato de etilo. La solución se extrajo con bicar-  
20 onato de sodio 1 N., agua, ácido cítrico 1,5 N. frío y agua.  
La fase orgánica se secó (sobre  $MgSO_4$ ) y se concentró para  
dar 3,93 g. (91 % del teórico) del compuesto del título.

$\alpha_D^{25}$  -101,51° (C = 1, MeOH).

25 Análisis, calculado para  $C_{16}H_{24}N_2O_3$  (292,4):

C, 65,73; H 8,27; N, 9,58

Encontrado: C, 66,03; H, 8,13; N, 9,85.

C. Sal clorhidrato de  $N^{\alpha}$ -etil-L-fenilalanilamida.

30 Se disolvió  $N^{\alpha}$ -t-butiloxicarbonil- $N^{\alpha}$ -etil-L-fenil-  
alanil amida (3,5 g.; 11,95 moles preparada en la parte B),  
en 40 ml. de ácido acético glacial recientemente preparado

1 que contenía ácido clorhídrico anhidro (1 N) y 1,5 ml. de  
anisol y 1,5 ml. de  $(C_2H_5)_3SiH$ . La mezcla resultante se agi-  
tó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se  
5 vertió después sobre éter y el precipitado resultante se re-  
cogió y se secó para dar 2,6 g. (96 % del teórico) del com-  
puesto del título.

p.f. 276-277° C.

Análisis, calculado para  $C_{11}H_{16}N_2OCl$  (227,7):

C, 58,02; H, 7,08; N, 12,30

10 Encontrado: C, 57,97; H, 7,26; N, 12,54.

D. N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-L-tirosil-D-alanil-glicil-  
N<sup>α</sup>-etil-L-fenilalanilamida.

15 A 50 ml. de DMF se agregaron 1,14 g. (0,005 moles)  
de la sal clorhidrato de N<sup>α</sup>-etil-L-fenilalanilamida (prepa-  
rada en la Parte C). La mezcla se enfrió a 0° C y después  
se agregaron 2,95 g. (0,002 moles) de la sal DCHA de N<sup>α</sup>-t-  
butiloxicarbonil-L-tirosil-D-alanilglicina. La mezcla se agi-  
tó a 0° C. durante 5 minutos y después se agregaron 675 mg.  
20 (0,005 moles) de HBT y 1,03 g. (0,005 moles) de DCC. La mez-  
cla de reacción se agitó a 0° C. durante 6,5 horas y después  
a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla se enfrió  
a 0° C. y se filtró. El filtrado se concentró a vacío para  
dar un aceite que se redisolvió en acetato de etilo, se ex-  
trajo con bicarbonato de sodio 1 N, ácido cítrico 1,5 N frío  
25 y agua. La fase orgánica se secó (sobre  $MgSO_4$ ) y se concentró  
a vacío para dar un aceite. El aceite se cromatografió sobre  
una columna de 40 cm x 3 cm. de gel de sílice de Grace y De-  
vison Grado 62 en cloroformo. El producto se eluyó utilizan-  
do un gradiente en etapas de cloroformo a una mezcla metal  
30 al 15 % en cloroformo. El producto se aisló de conformidad  
con el perfil de la capa fina de las fracciones recogidas

1 para dar 1,13 g. (39 % del teórico) del compuesto del título.  
25  
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -21,0° (C = 0,5, MeOH).

Análisis, calculado para C<sub>30</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (583,7):

C, 61,73; H, 7,08; N, 12,00

5 Encontrado: C, 60,35; H, 7,26; N, 11,25.

E. Sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-L-  
etil-L-fenilalanilamida.

Se disolvió el producto de la Parte D (1 g.; 1,71 moles), en 20 ml. de ácido trifluoroacético que contenía 3 ml. de anisol, y 3 ml. de (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>SiH. La mezcla se agitó a 10 0° C. durante 30 minutos. La mezcla se vertió después en éter y el precipitado resultante se recogió y se secó (660 mg.). El sólido se disolvió en suficiente solución tampón acuosa (1 % de piridina y 0,05 % de ácido acético) hasta 10 ml. y 15 la solución se aplicó a una columna de 2,5 cm x 90 cm. de DEAE-Sephadex A-25 (acetato) que se había equilibrado con el mismo tampón. El eluato fue revisado a 280 nm. y las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron. El sólido se disolvió en ácido acético 0,2 molar (10 ml.) y la solución se cromatografió sobre una columna 2,5 cm. x 99 cm. de 20 Sephadex G-10, que se había equilibrado con el mismo disolvente. El eluato se revisó a 280 nm y las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron para dar 448 mg. (48 % del teórico) del compuesto del título.

25  
28 [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -10,6° (C = 0,5, HCl 1 N).

Análisis, calculado para C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (543,6)

C, 59,65; H, 6,86; N, 12,88

Encontrado: C, 59,41; H, 7,26; N, 13,18.

Análisis de aminoácidos,

30 Encontrado: Tir, 1,03; Ala, 0,99; Gli, 0,97;

1

$\text{NH}_2$ , 0,93.

5

10

15

20

25

30

Los compuestos de la fórmula (I), son útiles como analgésicos. La actividad analgésica de los compuestos de la fórmula I se demuestra mediante la prueba de el ratón en la placa caliente. En esta prueba, se coloca un ratón en el interior de un cilindro de acrílico erecto, que comprende, como base, una superficie de plata caliente que se mantiene a 25 ° C. En esta prueba, se le proporciona al ratón, mediante inyección subcutánea, una cantidad predeterminada del compuesto de prueba disuelto o suspendido en un vehículo adecuado. Se deja transcurrir un período predeterminado después de la administración del compuesto de prueba, y se coloca el ratón en la superficie de la placa caliente. Se registran entonces los estados latentes, en segundos hasta la aparición de cada uno de dos fenómenos separados. En primer lugar se mide el estado de latencia hasta que el ratón lame su pata trasera y, en segundo lugar, el estado de latencia hasta que el ratón salta de la superficie de la placa caliente. Un agente que exhibe actividad analgésica produce un incremento en estos estados de latencia sobre los ratones de control que reciben inyecciones únicamente del vehículo. Esto debe ocurrir en una escala de dosis que no produzca una incapacitación o una falta de coordinación motora. Las siguientes tablas registran los resultados obtenidos en esta prueba comparándolos con un control salino. La tabla (I) proporciona un estado latente al lamido de la pata trasera y la tabla (II) proporciona el estado latente al salto de escape. El criterio para un efecto analgésico alternativo es el siguiente: el estado latente para el lamido de la pata trasera o para el salto de escape para un animal tratado debe ser igual a, o na-

1 yor que, el estado latente del control promedio más dos des  
viaciones normales del promedio. Cada resultado proporciona  
do en las siguientes tablas I y II representa el valor pro-  
medio más o menos el error normal.

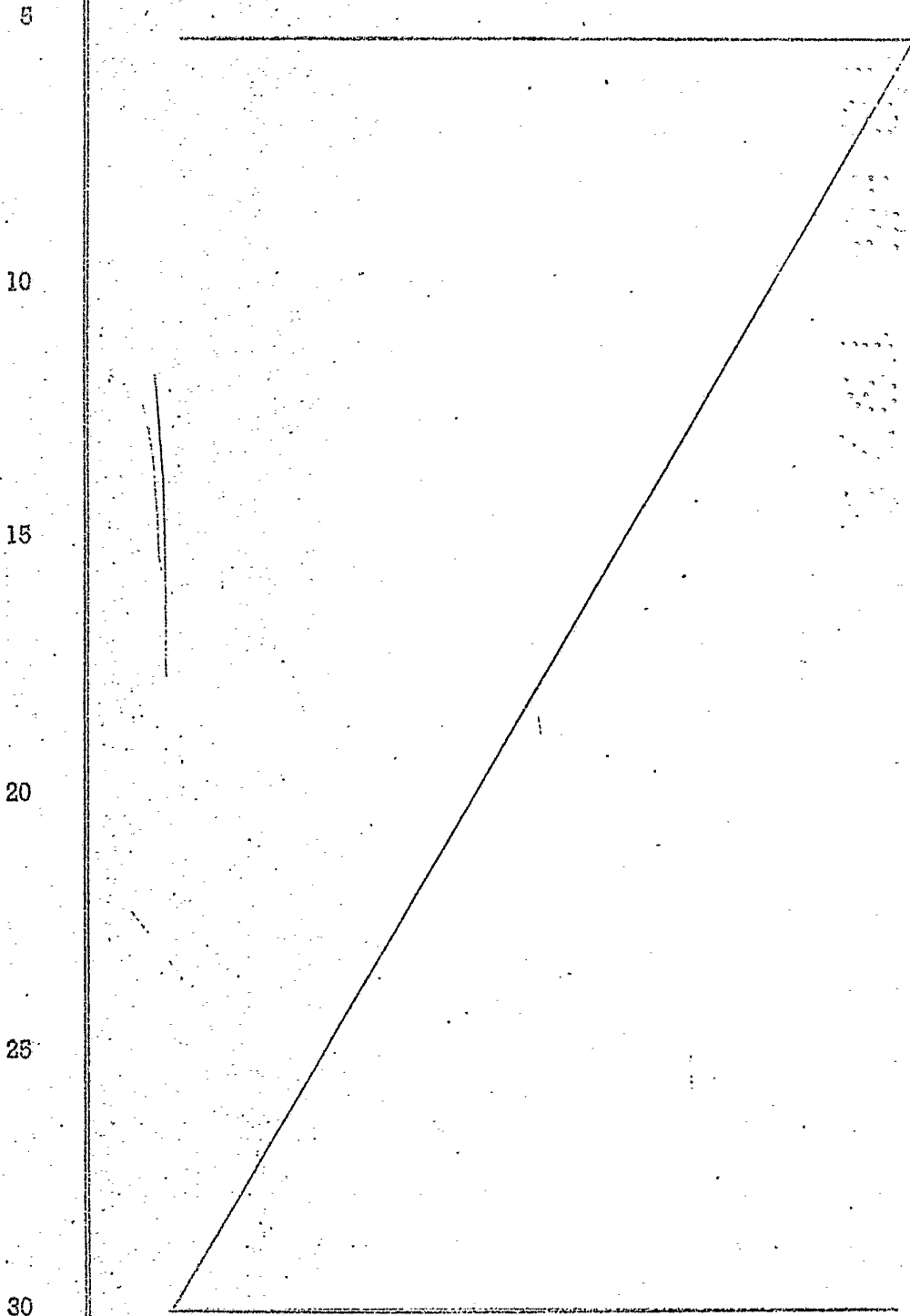


TABLA X

Actividad Analgésica

Estado latente al lapido de la pata trasera, segundos

5	Com- pues to <sup>b</sup>	Tiempo trans- curri- do, min.	Dosis, mg/kg. <sup>a</sup>					
			Control	0,3	1	3	10	30
A		15	26,6±1,7 -	-	33,2±2,2 <sup>3</sup>	114,4±24,4 <sup>2</sup>	-	
		15	31,4±3,1 -	33,3±2,2	48,1±7,6 <sup>3</sup>	-	-	
		10	15	33,4±2,2 -	-	-	101,7±15,9 <sup>1</sup>	-
		30	32,0±2,7 -	-	-	71,2±7,1 <sup>1</sup>	-	
		60	28,2±0,9 -	-	-	46,2±6,3 <sup>2</sup>	-	
		90	28,2±0,9 -	-	-	32,0±3,5	-	
15		15	26,9±3,1	29,4±2,7	-	-	-	
		15	25,0±1,9	34,0±1,5 <sup>1</sup>	-	-	-	
		120	28,0±1,7 -	-	-	30,2±2,9	-	
		B		15	29,2±1,7 -	-	35,7±2,3 <sup>3</sup>	63,4±12,6 <sup>3</sup>
15	31,4±1,7 -			34,8±2,5	40,5±2,7 <sup>2</sup>	-	-	
20	30			29,8±6,9 -	-	-	59,4±10,0 <sup>3</sup>	-
60	29,8±6,9 -			-	-	43,4±6,1	-	
15	25,0±1,9			31,9±1,9 <sup>3</sup>	-	-	-	
60	30,0±2,6 -			-	-	37,0±3,8	-	
25		90	30,0±2,6 -	-	-	30,1±3,9	-	
		120	23,7±1,4 -	-	-	29,6±3,6	-	
		120	28,0±1,7 -	-	-	25,8±1,6	-	
		C		15	26,4±1,8	32,9±2,3 <sup>3</sup>	32,4±2,4 <sup>3</sup>	-
15	26,1±1,7 -			-	35,2±2,7 <sup>2</sup>	58,1±5,1 <sup>1</sup>	-	
30				15	30,2±2,7	33,0±2,7	42,2±3,9 <sup>3</sup>	-
		15	25,7±1,1 -	-	54,2±7,2 <sup>1</sup>	260,0±10 <sup>1</sup>	-	

TABLE II

Actividad Analgésica

Estado latente al salto de escape, segundos.

5	Com- pues to <sup>b</sup>	Tiempo trans- curri- do, min.	Dosis, mg/kg. a					
			Control	0,3	1	3	10	30
10	A	15	48,4±4,7 -	-	-	133,1±34,8 <sup>1</sup>	222,2±19,1 <sup>1</sup>	-
		15	62,1±9,1 -	-	126,5±5,7 <sup>1</sup>	140,4±19,0 <sup>1</sup>	-	-
	10	15	80,2±7,4 -	-	-	-	237,3±2,7 <sup>1</sup>	-
		30	60,2±6,1 -	-	-	-	189,2±12,8 <sup>1</sup>	-
		60	80,5±8,8 -	-	-	-	105,0±14,2 -	-
		90	80,5±8,8 -	-	-	-	110,2±9,8 <sup>3</sup>	-
15	A	15	73,7±6,9	126,2±14,7 <sup>2</sup>	-	-	-	-
		15	63,7±9,1	107,0±8,1 -	-	-	-	-
20	A	120	69,8±4,2 -	-	-	-	104,7±7,0 <sup>1</sup>	-
		B	15	43,8±5,5 -	-	-	152,4±17,5 <sup>1</sup>	226,2±7,7 <sup>1</sup>
	15		62,9±10,3 -	-	112,2±21,2 <sup>3</sup>	144,3±13,2 <sup>1</sup>	-	-
	30		73,8±14,6 -	-	-	-	218,3±16,4 <sup>1</sup>	-
	60		73,8±14,6 -	-	-	-	89,4±16,7 -	-
	25	C	15	63,7±9,1	130,7±15,8 <sup>1</sup>	-	-	-
60			59,2±5,8 -	-	-	-	84,3±13,2 <sup>3</sup>	-
90			59,2±5,8 -	-	-	-	89,4±7,5 <sup>2</sup>	-
120			79,4±5,7 -	-	-	-	104,1±5,8 <sup>2</sup>	-
30	C	120	69,8±4,2 -	-	-	-	126,4±11,7 <sup>1</sup>	-
		15	62,7±7,5	118,9±15,5 <sup>2</sup>	120,6±14,2 <sup>1</sup>	-	-	-
		15	75,6±5,7 -	-	-	155,0±17,9 <sup>1</sup>	237,6±2,4 <sup>1</sup>	-
		D	15	63,8±7,7	121,2±15,7 <sup>2</sup>	185,1±15,0 <sup>1</sup>	-	-
15	79,1±7,7 -		-	-	218,4±16,2 <sup>1</sup>	240,0±0 <sup>1</sup>	-	

POOR QUALITY

1 Notas al pie:

a. Los números "1", "2", y "3" que aparecen sobreescritos, indican que el resultado significa P menor que 0,001, a P menor que 0,01 y a p menor que 0,05, respectivamente.

5 b. Las designaciones se refieren a los siguientes compuestos:

A. Sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-N<sup>1</sup>-metil-L-fenilalanilamida.

10 B. Sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-N<sup>2</sup>-metil-fenilalanilamida.

C. Sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-N<sup>3</sup>-n-propil-L-fenilalanilamida.

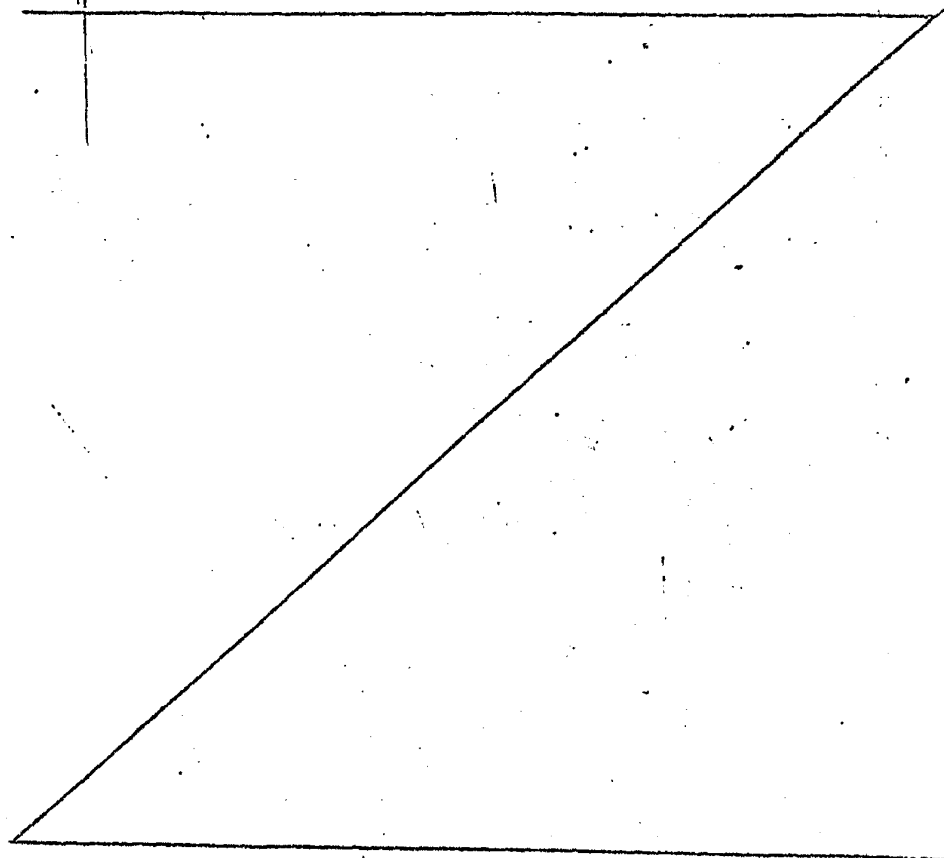
15 D. Sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-N<sup>4</sup>-etil-L-fenilalanilamida.

15

20

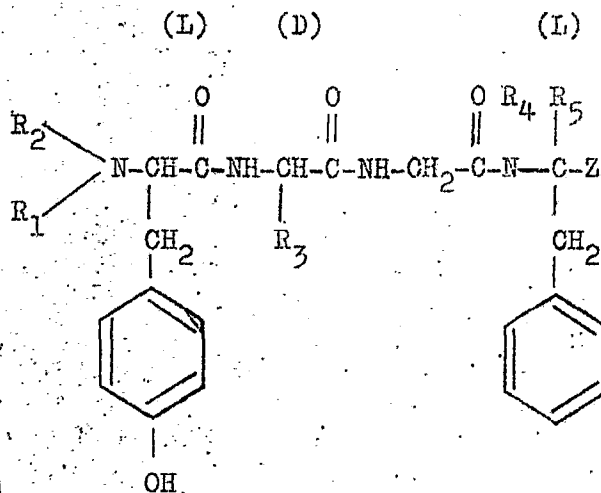
25

30



REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la preparación de un oligopéptido de fórmula general:



(1)

y sus sales de adición de ácido no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, en donde L y D, cuando son aplicables, definen la quiralidad; R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente son hidrógeno o alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono; R<sub>3</sub> es alquilo primario o secundario de 1 a 4 átomos de carbono o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>3</sub>; R<sub>4</sub> es hidrógeno o alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono; R<sub>5</sub> es hidrógeno o alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono, Y es hidrógeno o acétilo; y Z es -C(=O)-NH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, o -CN; con la limitación de que uno de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> es alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono, y el otro es hidrógeno cuyo procedimiento comprende someter a reacción de separación de los grupos de bloqueo el compuesto correspondientemente protegido de la fórmula (I) con un medio ácido.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1,

1 en donde el medio ácido es ácido trifluoroacético, ácido acético glacial con gas de HCl, o ácido fórmico.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde Y es hidrógeno.

5 4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son hidrógeno.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde R<sub>3</sub> es metilo.

10 6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde R<sub>4</sub> es alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono.

7.- Un procedimiento según la reivindicación 6, en donde R<sub>4</sub> es metilo.

8.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde R<sub>5</sub> es alquilo primario de 1 a 3 átomos de carbono.

15 9.- Un procedimiento según la reivindicación 8, en donde R<sub>5</sub> es metilo.

10.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en donde Z es  $\begin{matrix} O \\ || \\ -C-NH_2 \end{matrix}$ .

20 11.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el oligopéptido obtenido es la sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-N<sup>x</sup>-metil-L-fenilalanilamida, el compuesto de partida bloqueada es N<sup>x</sup>-t-butiloxicarbonil-L-tirosil-D-alanil-glicil-N<sup>x</sup>-metil-L-fenilalanilamida el medio ácido es ácido trifluoroacético y, posteriormente, se liofiliza en ácido acético.

25 12.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el oligopéptido obtenido es la sal acetato de L-tirosil-D-alanil-glicil-L-x-metil-fenilalanilamida, el compuesto de partida bloqueado es N<sup>x</sup>-t-butiloxicarbonil-L-tirosil-D-ala

30

1 nil-glicil-L- $\alpha$ -metilfenilalanilamida, el medio ácido es HCl  
en ácido acético glacial, y, posteriormente, se liofiliza en  
ácido acético.

5 13.- Un procedimiento, según la reivindicación 1,  
donde el oligopéptido obtenido es la sal acetato de L-tirosil-  
D-alanil-glicil-N<sup>α</sup>-n-propil-L-fenilalanilamida, el compues-  
to de partida bloqueado es N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-L-tirosil-  
D-alanil-glicil-N<sup>α</sup>-n-propil-L-fenilalanilamida, el medio áci-  
do es HCl en ácido acético glacial, y, posteriormente, se lio-  
10 filiza en ácido acético.

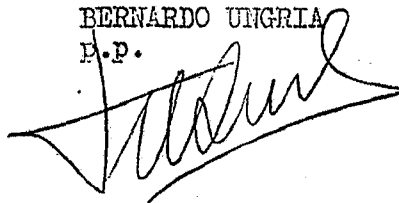
14.- Un procedimiento según la reivindicación 1,  
donde el oligopéptido obtenido es la sal de acetato de L-ti-  
rosil-D-alanil-glicil-N<sup>α</sup>-etil-L-fenilalanilamida, el compues-  
to de partida bloqueado es N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-L-tirosil-  
15 D-alanil-glicil-N<sup>α</sup>-etil-L-fenilalanilamida, el medio ácido  
es ácido trifluoroacético y, posteriormente, se liofiliza en  
ácido acético.

15.- Se reivindica por último como objeto sobre el  
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita por  
20 UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN OLIGOPEPTIDO.

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente memoria descriptiva que consta de cuarenta y ocho  
páginas mecanografiadas.

Madrid, 3 de Octubre de 1.978

BERNARDO UNGRIA  
E.P.



25

30