



1967

Case "G.242"

343931

343931

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por "PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN DECAPEPTIDO Y SUS SALES",
a favor de la firma italiana SOCIETÀ FARMACEUTICI ITALIA,
residente en MILANO (Italia), Largo Guido Donegani, 1-2.

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a un procedimiento para preparar un nuevo decapeptido de utilidad terapéutica y sus sales.

Más particularmente, el objeto de este invento

5. es un procedimiento para preparar el decapeptido L-piroglutamil-L-glutaminil-L-aspartil-L-tirosil-L-treonil-glicil-L-triptofanil-L-metionil-L-aspartil-L-fenilalanilamida, en el que el grupo fenólico del radical tirosílico está libre o bloqueado por un radical sulfúrico, mientras que el grupo

10. alcohólico del radical treonílico está libre o bloqueado

**POOR
QUALITY**

343931



por un radical acílico alifático que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, y sus sales atóxicas y farmacéuticamente aceptables con una base orgánica o inorgánica.

5. El decapeptido de este invento y sus derivados despliegan gran actividad biológica polivalente y pueden emplearse en la terapéutica de diversas afecciones, tanto en el campo humano como en veterinaria.

10. Existen numerosas posibilidades de síntesis del decapeptido de este invento, que consisten en esencia en la apropiada condensación sucesiva de aminoácidos o polipeptidos protegidos, condensación efectuada de tal modo que el decapeptido resultante tenga la secuencia descada de 10 aminoácidos, según métodos conocidos en la química de los polipeptidos.

15. Los aminoácidos y los polipeptidos que uno tras otro se condensan tienen debidamente protegidos por un grupo protector, capaz de ser eliminado de manera conocida por acidólisis o hidrogenólisis, sus grupos amínicos y carboxílicos no implicados en la formación del enlace peptídico.

20. Para la protección del grupo amínico cabe emplear los siguientes grupos protectores: tosilo (p-toluensulfonilo), carbobenzoxilo (carbobenciloxilo), carbobutoxilo terciario, tritilo (trifenil-metilo), formilo, trifluoroacetilo y otros que suelen emplearse en la química de los polipeptidos.

25. Para la protección del grupo carboxílico cabe emplear, por ejemplo, los grupos protectores siguientes: metilo, etilo, butilo terciario, bencilo, p-nitrofenilo y

343931



60. 1967

otros que suelen emplearse en este campo.

- La condensación entre el grupo amínico de una molécula y el grupo carboxílico de otra molécula para formar el enlace peptídico puede efectuarse según los métodos usuales, conocidos en la química de los polipéptidos; por ejemplo, por medio de un derivado acílico activado idóneo, como el anhídrido mixto, la acida, el éster p-nitrofenílico y el éster 2,4,5-triclorofenílico, o por condensación directa entre el grupo amínico libre y el grupo carboxílico libre, en presencia de un agente condensador idóneo, como una carbodiimida del grupo constituido por las dicitclohexilcarbodiimidias, las 1-ciclohexil-3-morfolinil-carbodiimidias y otros conocidos en la literatura. La condensación puede llevarse a cabo en un disolvente idóneo del grupo de las N,N-dialquil-formamidas, los nitrilos alifáticos inferiores y las piridinas, por ejemplo dimetilformamida, acetonitrilo o piridina; la reacción se inicia entre -20°C y la temperatura ambiente y puede completarse entre la temperatura ambiente y 35°C por un período de 12 a 120 horas.
20. Sales típicas del decapeptido de este invento son la sal sódica, la sal potásica, la sal magnésica, la sal cálcica, el gluconato, el tartrato, el maleato, la sal etilendiamínica y las otras sales atóxicas farmacéuticamente aceptables.
25. Como se ha dicho antes, existen muchas síntesis posibles para el decapeptido de este invento.



343931

Para ilustrar el invento se exponen a continuación algunos ejemplos de preparación.

El tetrapéptido L-piroglutamil-L-glutaminil-L-

- 5. -aspartil-L-tirosin-acida (I) se condensa con el hexapéptido L-treonil-glicil-L-triptofanil-L-metionil-L-aspartil-L-fenilalanilamida (II) que tiene el hidroxilo del radical treonílico bloqueado por un radical acílico, en un disolvente apropiado, como la dimetilformamida, para obtener el decapeptido L-piroglutamil-L-glutaminil-L-aspartil-L-tirosil-L-treonil-
- 10. -glicil-L -triptofanil-L-metionil-L-aspartil-L-fenilalanilamida (III), que tiene el grupo hidroxílico del radical treonílico bloqueado por un radical acílico. El decapeptido III se trata, a temperatura baja, con el complejo piridina anhídrido/anhídrido sulfúrico, para obtener finalmente el decapeptido
- 15. L-piroglutamil-L-glutaminil-L-aspartil-L-tirosil-L-treonil-glicil-L-triptofanil-L-metionil-L-aspartil-L-fenilalanilamida (IV), que tiene el grupo fenólico del radical tirosílico protegido por un radical sulfúrico y el hidroxilo del radical treonílico protegido por un radical acílico.

- 20. Por último, mediante hidrólisis alcalina blanda del decapeptido (IV) se obtiene el decapeptido L-piroglutamil-L-glutaminil-L-aspartil-L-tirosil-L-treonil-glicil-L-triptofanil-L-metionil-L-aspartil-L-fenilalanilamida (V), en el que el grupo hidroxílico del radical treonílico está libre.

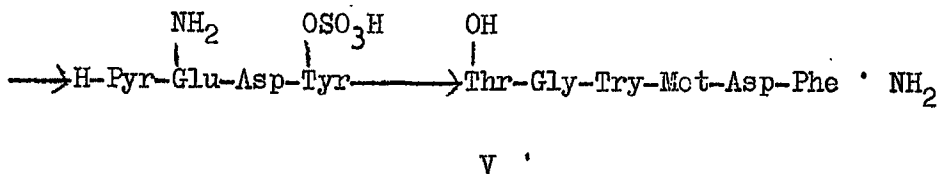
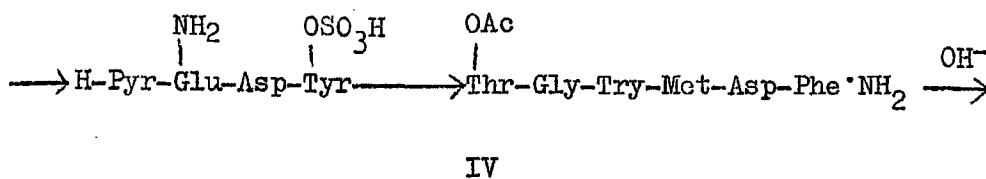
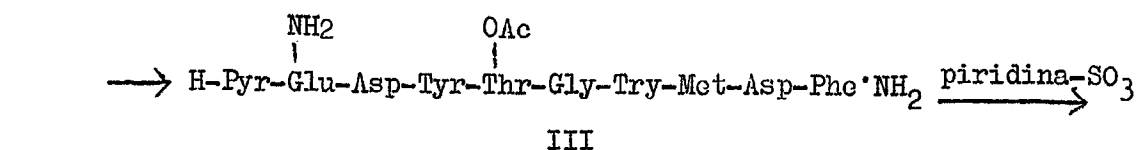
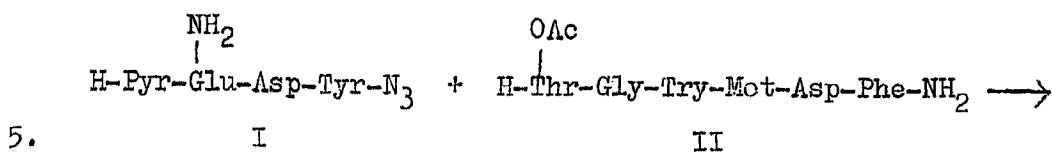
- 25. La condensación que acaba de exponerse puede representarse por medio del esquema siguiente, con los símbolos

343931



1967

empleados de ordinario en la química de los polipéptidos:

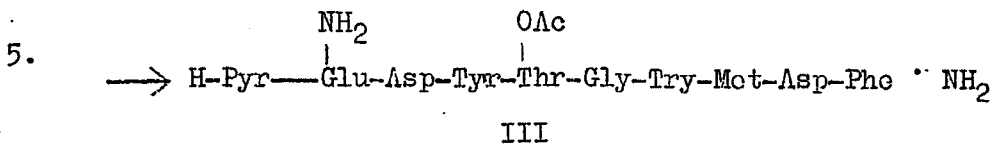
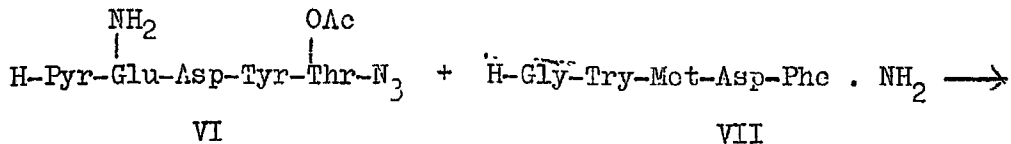


donde Ac representa un radical acílico alifático con 1 a 4 átomos de carbono.

Como se ha dicho antes, existen diversas variantes para preparar el decapeptido (III, IV, V) siguiendo los métodos bien conocidos en la química de los polipéptidos para la formación de una cadena polipeptídica. Un ejemplo de ello es el siguiente:



343931



10. A partir del decapeptido III se obtiene el decapeptido V tal como se ha expuesto antes.

Se obtienen también resultados análogos si en lugar de la condensación a través de la acida se emplea otra condensación a través de ésteres p-nitrofenílicos o 2,4,5-triclorofenílicos.

15. El decapeptido de este invento, provisto de un radical de ácido sulfúrico, da sales con las bases orgánicas y las bases inorgánicas; tanto este producto como sus derivados tienen gran acción biológica polivalente: en efecto, despliegan actividad hipotensora y estimulan la motilidad del tracto gastroentérico y las diversas secreciones de las glándulas anexas.

20.

El ejemplo que sigue sirve para ilustrar el invento sin limitarlo.



343931

E J E M P L O

NH₂

Preparación del primer intermediario: H-Pyr-Glu-Asp-Tyr-
-NH-NH₂ (I)

5. 7,5 gramos de carbo-tercibutoxi-L-tirosina (J. Am. Chem. Soc. 75, 1953, pág. 950) se condensan, pasando por el anhídrido mixto etoxifórmico, según el método descrito por Greenstein y colaboradores, "Aminoacid chemistry", 1961, pág. 978, con 4,150 g de carbobenzoxi-hidracina (Ber. 47, 1914, pág. 2183). Después de una noche a la temperatura ambiente, se evapora la mezcla en vacío hasta sequedad y el residuo oleoso, disuelto en acetato de etilo, se lava en frío con ácido clorhídrico 0,5-n, con una solución acuosa de bicarbonato sódico y con agua hasta neutralidad.
10. Se evapora la mezcla en vacío hasta sequedad y el residuo oleoso, disuelto en acetato de etilo, se lava en frío con ácido clorhídrico 0,5-n, con una solución acuosa de bicarbonato sódico y con agua hasta neutralidad.
15. Se evapora la mezcla en vacío hasta sequedad y se cristaliza el residuo en éter/éter de petróleo. Mediante recristalización sucesiva en acetato de etilo/éter de petróleo se obtienen 7,700 g de CTB-Tyr-NH-NH-CBO, que funde a 118-120°C; $[\alpha]_D^{20} = -1,7^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida). 2,2 g de este
20. producto se dejan reposar durante 40 minutos a la temperatura ambiente, en una solución de ácido clorhídrico anhidro en ácido acético glacial (1,33-n). Se evapora la mezcla en vacío hasta sequedad, se recoge el residuo oleoso y se le suspende con éter anhidro. El producto sólido así obtenido se filtra, se
25. lava con éter anhidro y se seca. Se obtienen 1,89 g de H-Tyr-NH-NH-CBO · HCl, fundente a 125-128°C (con descomposición);



343931

- [α]_D²¹ = 38,3° (c = 1 en ácido acético al 95%; E_{1,2} = 0,75
Glu. A la solución de este producto en dimetilformamida,
en presencia de un equivalente de trietilamina, se añade en
frío un equivalente del anhídrido mixto preparado en tetrahi-
drofurano anhidro a partir de 1,616 g de CTB-^{OBz}Asp-OH (J. Am.
5. Chem. Soc. 81, 1965, pág. 620) y 0,542 g de cloroforniato de
otilo, según Greenstein y colaboradores. (loc. cit.). Después
de una noche a la temperatura ambiente, se evapora la mezcla
en vacío hasta sequedad, se recoge el residuo oleoso con
10. acetato de etilo y se le lava con ácido clorhídrico 0,5-n,
con una solución acuosa de bicarbonato sódico y con agua,
hasta neutralidad. Después de eliminar el disolvente, se
cristaliza el residuo oleoso en cloroformo/éter de petróleo,
lo que da 2,8 g de CTB-^{OBz}Asp-Tyr-NH-NH-CBO ; fundente a 138-140°C;
15. [α]_D²⁰ = -20,7° (c = 1% en dimetilformamida). 1,100 g de
este producto se dejan reposar durante 40 minutos, a la tem-
peratura ambiente, en una solución (1,33-n) de ácido clorhí-
drico anhidro en ácido acético glacil. Se elimina el disolven-
te en vacío, se suspende en éter anhidro la espuma blanca
20. residual y el sólido así obtenido se filtra y se seca. Se
obtienen 1,03 g de H-^{OBz}Asp-Tyr-NH-NH-CBO · HCl (VIII) (E_{1,2} = 0,65
Glu). A la solución de este producto en dimetilformamida, en
presencia del equivalente de trietilamina, se añaden 0,624 g de
CTB-^{NH₂}Glu-ONP (este producto, fundente a 150-153°C, puede
25. prepararse a base de CTB-^{NH₂}Glu-OH y p-nitrofenol en presencia

- 9 - 343931



- de un agente de condensación, como la dicitclohexilcarbo-
diimida). Se mantiene la mezcla en agitación a 35°C durante
2 días, se la evapora en vacío hasta sequedad y se recoge con
acetato de etilo el residuo oleoso. Después de los lavados
5. ácidos y alcalinos, se cristaliza en metanol/benceno y sucesi-
vamente en acetona/éter de petróleo.
- Se obtiene $\text{CTB-Glu} \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ | \end{matrix} \text{---} \begin{matrix} \text{OBz} \\ | \end{matrix} \text{Asp-Tyr-NH-NH-CBO}$, fundente
a 173-175°C; $[\alpha]_D^{20} = -22,2^\circ$ (c = 1% en dimetilformamida).
2,55 gramos de este producto se dejan reposar durante 40 mi-
10. nutos, a la temperatura ambiente, en una solución de ácido
clorhídrico en ácido acético glacial (1,33-n). Se elimina
el disolvente, se recoge la espuma residual y se la suspende
con éter anhidro. Filtrando y secando se obtienen 2,08 g de
 $\text{H-Glu-Asp-Tyr-NH-NH-CBO.HCl} \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ | \end{matrix} \begin{matrix} \text{OBz} \\ | \end{matrix}$; $E_{1,2} = 0,59$ Glu.
15. A la solución de este producto en dimetilformamida,
en presencia del equivalente de trietilamina, se añaden
1,114 g de CBO-Pyr-ONP, preparado según Ann. 640, 1961,
pág. 145, se mantiene la mezcla a 35°C durante 2 días y luego
se la evapora hasta sequedad y se recoge el residuo con aceta-
20. to de etilo y agua. El filtrado insoluble se lava sobre el
propio filtro con ácido clorhídrico acuoso 1-n, en frío, con
una solución de bicarbonato sódico y con agua, hasta neutra-
lidad. Se seca la mezcla y se la cristaliza en metanol. Se
obtienen 1,7 g de $\text{CBO-Pyr-Glu-Asp-Tyr-NH-NH-CBO} \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ | \end{matrix} \begin{matrix} \text{OBz} \\ | \end{matrix}$, fundente
25. a 200-205°C; $[\alpha]_D^{20} = -28,3^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida).



343931

- 2 g de este producto se disuelven en 30 cc de dimetilformamida y se hidrogenan en presencia de carbón paladiado al 10%. Se filtra el catalizador, se lava bien con dimetilformamida y se evapora el filtrado en vacío hasta sequedad. Se recoge el
5. residuo con éter anhidro, se lo filtra y se le seca. Se obtiene 1,00 g de $\text{H-Pyr-Glu-Asp-Tyr-NH-NH}_2$ (con descomposición); $E_{1,2} = 0,54$ Glu.

10. Preparación del segundo intermediario: H-Thr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂.HCC (II)

15. A una solución de 1,04 g de H-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ (preparado según J. Chem. Soc. 1966, pág. 555) en 7 cc de dimetilformamida, se añaden 0,46 cc de trietilamina y 0,563 g de CTB-Gly-ONP (preparado según Helv. Chim. Acta 45, 1963, pág. 1637) y se deja reposar la mezcla durante 4 días a la temperatura ambiente. Luego se evapora el disolvente en vacío, se recoge el residuo con agua y con acetato de etilo, se lava la capa orgánica con ácido clorhídrico diluido y
20. luego con una solución acuosa al 5% de bicarbonato sódico, se evapora la mezcla hasta sequedad y se cristaliza en metanol/éter. Se obtienen 0,95 g de CTB-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ (XI), que funde a 190°C. Entretanto, se prepara éster triclороfenílico de carbo-tercibutoxi-O-acetil-L-treonina, de la fórmula CTB-Thr-OCP, procediendo así: 8 g de H-Thr-OH (preparado según J. Org. Chem. 29, 1964, pág. 1629) disueltos en
- 25.

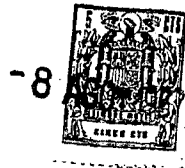


1967

343931

- 100 cc de dimetilformamida se tratan con 11,9 g de carbonato de p-nitrofenil-butilo terciario y con 14 cc de trietilamina. Al cabo de 4 días, se añaden 2,4 g más de carbonato de nitrofenil-butilo terciario y se deja reposar la solución.
5. otros dos días. Se evapora la solución hasta sequedad, se la recoge con una solución acuosa al 5% de bicarbonato sódico y éter y la solución acuosa se acidifica y se extrae con éter. Eliminando el éter, se obtienen 3,7 g de un residuo oleoso, que se diluye con 30 cc de acetato de etilo y se
10. trata con 3,14 g de dicitclohexilamina (DCEA). Por adición de éter se separan 4,9 g de $\text{CTB-Thr-OH} \cdot \text{DCEA} \cdot \text{OAc}$, fundente a 180°C, $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida). 13,2 gramos de esta sal se tratan a 0°C con una solución de ácido fosforoso hasta viraje ácido al rojo Congo; se separa
15. un aceite, que es extraído con acetato de etilo. Por evaporación del disolvente, se obtiene $\text{CTB-Thr-OH} \cdot \text{OAc}$ en forma de una espuma (7,3 g). Este producto, disuelto en 60 cc de acetato de etilo, se mezcla con 5,9 g de 2,4,5-triclorofenol y 6,2 g de dicitclohexilcarbodiimida. Al cabo de 2 días, se
20. filtra la mezcla y se la evapora hasta sequedad. Se obtienen 13,2 g de $\text{CTB-Thr-OCP} \cdot \text{OAc}$, en forma de un aceite, que se usa como tal.

- 0,9 gramos de H-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ se disuelven en 10 cc de dimetilformamida y se mezclan con 0,95 g de $\text{CTB-Thr-OCP} \cdot \text{OAc}$ y 0,2 cc de trietilamina. Se mantiene la mezcla a 32°C durante 5 días, se evapora el disolvente en
- 25.



343931

vacío, se recoge el residuo con agua y se le cristaliza en dimetilformamida/acetato de etilo, para obtener un producto fundente a 183-185°C, $[\alpha]_D^{20} = -17^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida).

5. 0,6 gramos del CTB-Thr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂, así obtenido se dejan reposar durante 30 minutos a la temperatura ambiente, en una solución de ácido clorhídrico anhidro en ácido acético glacial (1,5-n). Por adición de éter se precipita
10. $\begin{matrix} \text{OAc} \\ | \\ \text{H-Thr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH}_2 \end{matrix} \cdot \text{HCl}$ fundente a 155°C (con descomposición); $[\alpha]_D^{21} = -8^\circ$ (c = 1 en ácido acético al 95%); E_{1,2} = 0,51 Leu.

Preparación de los decapeptidos III, IV y V.

15. 0,41 g de H-Pyr-Glu-Asp-Tyr-NHNH₂, disueltos en 7 cc de dimetilformamida, se tratan a -20°C con 0,75 cc de una solución 2-n de ácido clorhídrico anhidro en tetrahydrofurano y luego con 0,09 cc de nitrito de butilo terciario. Al cabo de 6 minutos, se añaden 0,35 cc de trietilamina y una solución,
20. enfriada a -20°C, de $\begin{matrix} \text{OAc} \\ | \\ \text{H-Thr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH}_2 \end{matrix} \cdot \text{HCl}$ en 2,5 cc de dimetilformamida. Transcurridos 5 minutos más, se añade 0,1 cc de trietilamina y se mantiene la mezcla 1 hora a -15°C y 5 días a 0°C. Se elimina luego el disolvente en vacío y se suspende el residuo en una solución
25. de ácido cítrico. Después de evaporación hasta sequedad, se lava con éter y a continuación, repetidamente, con acetato de

= 13 =

343931



etilo. Se obtienen 0,42 g de H-Pyr-Glu-Asp-Tyr-Thr-Gly-Try-Met-
 Asp-Phe-NH₂ (III), fundente a 215°-217°C (con descomposición);
 [alfa]_D = -21° (c = 1,1 en dimetilformamida); E_{5,8} = 0,33 Glu.

0,42 gramos de este producto en 6 cc de piridina

5. anhidra se añaden, a temperatura de -10°C, a 2 g del complejo piridina/SO₃, suspendidos en 10 cc de piridina anhidra. Se mantiene la mezcla a la temperatura ambiente durante toda una noche y luego se la vierte en agua y se trata el residuo con una solución acuosa 1-n de hidróxido sódico, hasta viraje
10. persistente a la timol-ftalcina. Procediendo a la purificación en contracorriente con el sistema butanol/etanol/ácido acético/agua (80:16:16:128) (80 pasadas, K = 4,3), se obtienen 0,15 g de H-Pyr-Glu-Asp-Tyr-Thr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ (V); E_{1,9} = 0,54 Cys(SO₃H); E_{5,8} = 0,41 Glu.
15. El producto así obtenido puede salificarse fácilmente con una base orgánica o inorgánica, para obtener las sales respectivas.

E J E M P L O 2

20. Se procede a preparar el decapeptido V tal como se ha descrito en el Ejemplo.1, pero substituyendo la preparación del tetrapeptido intermediario IX a partir del dipéptido VIII por la siguiente:

NH₂

Se condensan 2,465 g de CTB-Glu-OH pasando por el anhídrido etoxifórmico mixto (véase la referencia citada

- 8 AGO.



343931

OBz

- antes), con 5,71 g de H-Asp-Tyr-NH-NH-CBO · HCl (preparado tal como se ha expuesto en el Ejemplo 1). Se deja reposar la mezcla reaccional durante una noche a la temperatura ambiente, se evapora el disolvente en vacío y se disuelve el residuo en agua y acetato de etilo. Se separa la capa orgánica y se la lava, en frío, con una solución al 3% de ácido cítrico, con una solución al 5% de bicarbonato sódico y luego con una solución al 30% de cloruro sódico. Después de secar sobre sulfato sódico, se evapora el disolvente en vacío y se suspende el residuo con éter. Filtrando la mezcla y evaporando el disolvente hasta sequedad, se obtienen 6,68 g de CTB-Glu-Asp-Tyr-NH-NH-CBO, fundente a 173-175°C. Con la recristalización en acetona/éter de petróleo, el punto de fusión no cambia. $[\alpha]_D = -22,5^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida).
15. 0,526 g de CBO-Pyr se condensan, pasando por el anhídrido mixto, con 1,418 g de H-Glu-Asp-Tyr-NH-NH-CBO · HCl, obtenido tratando CTB-Glu-Asp-Tyr-NH-NH-CBO con una solución 1,33-n de ácido clorhídrico en ácido acético glacial.
- Se deja reposar la mezcla reaccional durante la
20. noche a la temperatura ambiente, se evapora el disolvente en vacío y se suspende el residuo sólido, en frío, con una solución al 3% de ácido cítrico. Después se le lava bien con agua, se le vuelve a suspender con acetato de etilo y éter, se filtra la mezcla y se evapora el disolvente hasta sequedad.
25. Por recristalización en metanol, se obtienen 1,35 g de



1967

343931

NH_2 OBz
CBO-Pyr-Glu-Asp-Tyr-NH-NH-CBO, fundente a 200-205°C. Una muestra analítica funde a 205-207°C. $[\alpha]_D^{20} = -28,3^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida).

5. EJEMPLO 3

Se procede a preparar el decapeptido V tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, pero substituyendo la preparación del pentapeptido intermediario XI a partir del tetrapeptido X de la manera siguiente:

10.

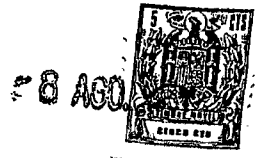
Se deja reposar a 28°C, durante una semana, una solución de 8,47 g de CTB-Gly-ONP, 12,08 g de H-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ . HCl (X), 5,32 cc de trietilamina, 1,34 g de 1,2,4-triazol y 0,2 cc de ácido acético glacial en 60 cc de dimetilformamida.

15.

Se filtra la solución, se la concentra en vacío, se la acidifica en frío con una solución saturada de ácido cítrico y se la diluye con agua. El precipitado así obtenido se lava y se suspende con éter; se filtra la mezcla y se la lava alternativamente con agua y con éter. Por recristalización en metanol/acetato de etilo/éter, se obtienen 11,10 g de CTB-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ (XI), fundente a 192°C (con descomposición). Una muestra analítica, recristalizada en dimetilformamida/acetato de etilo/éter, funde a 196°C (con descomposición).

20.

25. $[\alpha]_D^{23} = -27,3^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida).



343931

5. Se agita a 25°C, durante 35 minutos, una suspensión de 10,00 g de CTB-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ en 120 cc de una solución 1,33-n de cloruro de hidrógeno en ácido acético glacial. Se evapora el disolvente en vacío, se recoge el residuo con éter anhidro, se le filtra y se le recristaliza en metanol/isopropanol. Se obtienen 8,43 g de H-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ · HCl, fundente a 182-183°C (con descomposición). $[\alpha]_D^{22} = -17^\circ$ (c = 1 en ácido acético al 95%); $E_{1,2} = 0,59$ Glu, 0,55 Leu.

10. EJEMPLO 4

Se procede a preparar el decapeptido V de la manera que se ha descrito en el Ejemplo 1, pero substituyendo el paso de la preparación de V a partir de III por el siguiente:

15. 1 g de H-Pyr-Glu-Asp-Tyr-Thr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ (III) en 30 cc de dimetilformamida anhidra se añade, a -10°C, a 15,9 g de un complejo de piridina/SO₃ suspendido en 80 cc de piridina anhidra. Se deja reposar la mezcla durante la noche a la temperatura ambiente y luego se la evapora en vacío hasta sequedad. El residuo se disuelve en 150 cc de la capa inferior de la mezcla butanol normal/etanol/agua (5:1:8) y se ajusta el pH a 3,2 con hidróxido sódico 1-n.

20. Se extrae la mezcla cinco veces con 100 cc de la capa superior de la mezcla antes indicada. Se evaporan los extractos en vacío y se recoge el residuo con cloroformo.

25. Luego se filtra la mezcla, se lava el filtrado con cloroformo

343931



y con éter dietílico y se lo evapora hasta sequedad. Se obtie-
non 900 mg de H-Pyr-Glu-Asp-Tyr-Thr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂.

Después de hidrólisis alcalina débil de este producto, seguida
por acidificación y extracción con la capa superior del sistema

5. disolvente antes indicado, se obtienen 700 mg del decapeptido
bruto V, fundente a 224^a-226^aC (con descomposición). El pro-
ducto así obtenido puede purificarse por cromatografía.

Farmacología

10. Se han determinado las acciones biológicas de los
productos de este invento, y principalmente la acción sobre la
secreción gástrica, sobre la motilidad colecística, sobre
las secreciones pancreáticas, sobre la secreción biliar y
sobre el riego sanguíneo arterial. Los resultados obtenidos
15. de estos experimentos figuran en las tablas que siguen, en
las cuales la actividad correspondiente al producto del
invento, Pyr-Glu(NH₂)-Asp-Tyr(SO₃H)-Thr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-
NH₂ (1), se asume igual a 100 y se compara, en peso, con la
gastrina humana constituida por el polipeptido Pyr-Gly-Pro-
20. try-Leu-(Glu)₅-Ala-Tyr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂ y con el
pentapeptido sintético similar a la gastrina (I.C.I. 50,123)
CTB-β -Ala-Try-Met-Asp-Phe-NH₂.

25. Más particularmente, la tabla 1 indica los valores
correspondientes a las acciones farmacológicas siguientes:

8 AGO. 1967



343931

5. Columna I - Acción sobre la secreción clorhídrica: se ha calculado "in vivo" por el aumento de volumen del jugo gástrico y por la acidez del jugo segregado. Los productos en examen se administraron por vía subcutánea en el perro y en la rata.
10. Columna II - Acción sobre la motilidad colcística: se ha calculado in situ sobre el colcisto del conejillo de indias por administración endovenosa de los productos.
15. Columna III - Acción sobre la secreción biliar: se ha determinado por el aumento del flujo biliar y de la concentración de colesterol de la bilis en la rata, por administración endovenosa de los productos.
20. Columna IV - Acción sobre el riego sanguíneo arterial: se ha determinado por medio de un flujómetro ubicado sobre la arteria pancreático duodenal, después de administración endovenosa de los productos en el perro.



343931

T A B L A 1

Compuestos	I		II	III	IV
	Secreción clorhídrica en el perro	on la rata			
Pyr-Glu(NH ₂)- Asp-Tyr(SO ₃ H)- Thr-Gly-Try- Met-Asp-Phe.NH ₂	100	100	100	100	100
Gastrina humana	30	2	0.03	2	-
CTB-β-Ala-Try- -Met-Asp-Phe.NH ₂	3	2	0.005	0.2	3

En la Tabla 2 se indica la dosis activa mínima (MD) del decapeptido Pyr-Glu(NH₂)-Asp-Tyr(SO₃H)-Thr-Gly-Try-Met-Asp-Phe-NH₂, determinada en diferentes pruebas.



343931

TABLA 2

Pruebas	MD	Vía de administración
5. Secreción clorhídrica estomacal (en el perro)	100 ng/kg	Subcutánea
Secreción clorhídrica estomacal (en la rata)	15 ng/kg	endovenosa
Secreción estomacal (en la rana)	0.0025 ng/cc	in vitro
10. Secreción pancreática externa (en el perro)	3 ng/kg	endovenosa
Secreción pancreática externa (en el gato)	10 ng/kg	endovenosa
15. Motilidad colecística (en el conejillo de indias)	0.2 ng/kg	endovenosa
Secreción biliar (en la rata)	1000 ng/kg	endovenosa
20. Vasodilatación del distrito pancreático duodenal (en el perro)	4 ng/kg	endovenosa
Reducción de la presión sanguínea arterial (en el perro)	100 ng/kg	endovenosa

[1 ng = 0.001 μ g]



343931

Los productos de este invento pueden emplearse clínicamente, sobre todo en la colecistografía, en el estímulo de la secreción pancreática y la secreción gástrica, en la hipertensión arterial y para alcalinizar el contenido duodenal
5. en el caso de úlceras del duodeno.

Estos productos pueden administrarse por vía oral o parenteral, en forma de las composiciones terapéuticas empleadas de ordinario.

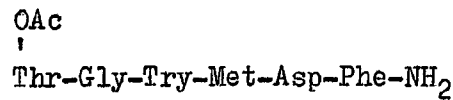
343931

= 23 =

343931

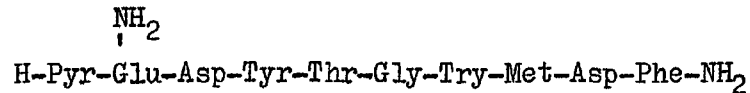


con un compuesto de la fórmula

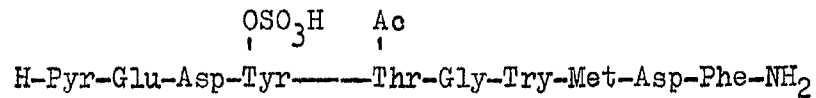


en la que

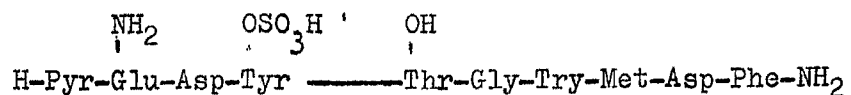
5. Ac es el radical acílico de un ácido alifático que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, en un disolvente apropiado, y, optativamente, sulfurarse el deca péptido obtenido de la fórmula



10. con un complejo anhidro de piridina/anhídrido sulfúrico y, optativamente, hidrolizarse en condiciones alcalinas suaves el deca péptido resultante, de la fórmula



15. para obtener el deca péptido de la fórmula



2. Procedimiento para preparar un deca péptido y sus sales.

20. Según se describe y reivindica en la presente

343931

= 24 =



memoria descriptiva que consta de 24 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 8 de Agosto de 1967

p.a.

JAIMESERN

P. P.

~~Manuel ROQUE SANZ HERRERO~~