

414.252



414252

F.C. 5-11-75
COFC, AGIK

PATENTE DE INVENCION

que por 20 años, para España y sus Posesiones, se solicita a favor de AKTIEBOLAGET BOFORS de nacionalidad sueca, domiciliada en BOFORS (Suecia), por "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN NUEVO SUBSTRATO PARA USO DIAGNOSTICO, ALTAMENTE SENSIBLE A LA TROMBINA Y OTRAS ENZIMAS PROTEOLITICAS DEL TIPO PEPTIDO PEPTIDOHIDROLASAS". - - - - -

Memoria descriptiva

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de nuevos substratos para uso diagnóstico muy sensibles a las enzimas proteolíticas del tipo péptido peptidohidrolasas. Los substratos según la invención están destinados para la determinación cuantitativa de enzimas clasificadas y hasta 5 quí sin clasificar del tipo E.C. 3.4.4., y especialmente de las que componen los péptidos o proteínas en la cadena de péptidos del lado carboxílico de la arginina o lisina, por ejemplo la trombina, tripsina, plasmina, Reptilasa (R) de Pentapharm, Basilea, Suiza, Arvine (R) de Ferring AB, Malmö, Suecia, y la enzima Brinase (R), hasta quí sin clasificar, de AB Astra, Södertälje, 10 Suecia. Los substratos, además, pueden ser usados para el estudio de las



414252

reacciones en las cuales se forman, inhiben o consumen tales enzimas, y también para determinar factores que afectan tales reacciones o participan en ellas, por ejemplo para la determinación de proenzimas, activadores, anti-enzimas e inhibidores.

15 Para la clasificación de las enzimas se empleó la Nomenclatura de Enzimas recomendada por la Unión Internacional de Bioquímica Elsevier, Amsterdam, 1965.

Los compuestos (substratos) que han sido usados para la determinación cuantitativa de las enzimas anteriormente mencionadas están descritos en la obra "Methoden der enzymatischen Analyse, Tomo I, pág. 1023" (publicada por Bergmeyer, H.U., Verlag Chemie, 1970). Según la reacción catalítica de las enzimas proteolíticas que tiene lugar - la reacción esterolítica o la amidolítica - dichos substratos sintéticos pueden ser divididos, en principio, en dos grupos principales : los substratos estéricos y los substratos amídicos. El grupo más grande de substratos sintéticos usado en el pasado es el de los substratos estéricos. Esto es debido al hecho de que los mismos son transformados mucho más rápidamente por las péptido peptidohidrolasas que los substratos amídicos hasta aquí producidos. Sin embargo, la principal función biológica de las enzimas clasificadas como péptido peptidohidrolasas es la que resulta evidente por su nombre : la de hidrolizar los enlaces peptílicos o amídicos, pero no los enlaces estéricos de los substratos naturales. En la literatura (Blood Clotting Enzymology, págs. 36 y 42-44, publicada por Seegers W.H., Academic Press, 1967), se informa de que la relación entre las velocidades de reacción de las catálisis esterolítica y amidolítica de la trombina no es constante en condiciones distintas de reacción. Por esta razón, han sido deseables los substratos de amida sintéticos que son mucho más sensibles a las enzimas en cuestión y que pueden también ser descompuestos en productos mensurables más rápidamente que los hasta aquí conocidos.

Para el estudio y el seguimiento del curso de reacción de la hidrólisis enzimática, los substratos amídicos son particularmente adecuados, ya que



414252

pueden proporcionar :

- a) productos cromofóricos fáciles de medir espectrofotométricamente y que tienen máximos de absorción de luz que no coinciden con los de los substratos amídicos de origen;
- 45 b) productos fluorescentes que pueden ser medidos mediante espectrofotometría fluorescente;
- c) productos que, una vez acoplados con un reactivo adecuado, dan origen a productos de acoplamiento que pueden ser medidos fotométricamente de gran sensibilidad.

50 Algunos substratos amídicos sintéticos con grupos cromofóricos hidrolizables han empezado a ser usados. Los mismos pertenecen en primer lugar a los tipos de derivados de mono-aminoácido-p-nitroanilida N alfa-sin sustituir y N alfa-sustituídos y de derivados de mono-aminoácido-beta-naftilamida. Entre estas sustancias, puede mencionarse como reactivo para la tripsina (E.C.
55 3.4.4.) el clorhidrato de N alfa-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA), así como para las reacciones en las que interviene la tripsina. La hidrólisis enzimática de este substrato produce el producto cromofórico p-nitroanilina que puede fácilmente ser medido espectrofotométricamente.

Sin embargo, estos substratos amídicos anteriormente conocidos no poseen
60 ni la especificidad ni la sensibilidad deseadas. Este es un importante inconveniente, que puede requerir un procedimiento más complicado para la toma de muestras porque, entonces, se necesitará una considerable cantidad de material biológico. Además, el tiempo de la reacción enzimática es largo y la precisión de la determinación de la enzima puede ser poco satisfactoria.

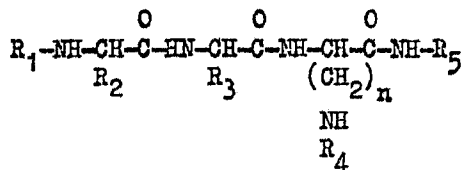
65 Especialmente para la trombina, no existe ningún substrato amídico sintético que funcione satisfactoriamente. BAPNA, por ejemplo, es usado principalmente para la tripsina, pero no es muy adecuado para la determinación de la trombina por tener una sensibilidad baja a dicha enzima y porque no sigue las cinéticas de Michaelis-Menten. Los nuevos substratos de tipo amídico según
70 la invención, muy sensibles a las péptido peptidohidrolasas, están repre-

414252

30



sentados por la siguiente fórmula general :



75

o sus sales, pudiendo R₁ ser elegido entre hidrógeno, un acilo con 1 a 12 átomos de carbono, un omega-aminoacilo con 1 a 12 átomos de carbono, un ciclohexilcarbonilo, un omega-ciclohexil-acilo, un 4-aminometil-ciclohexil-carbonilo, benzóilo, benzóilo sustituido por ejemplo con uno o más átomos de halógeno, grupos metilo, amino o fenilo etc., un omega-fenil-acilo con 1 a 6 átomos de carbono en la parte acilo y donde el grupo fenilo puede estar sustituido; bencen-sulfonilo, 4-toluen-sulfonilo y N alfa-benzóil-fenil alanilo,

80

R₂ ser elegido entre fenilo, bencilo, 4-hidroxibencilo, 4-metoxibencilo y 4-metilbencilo,

85

R₃ ser elegido entre un grupo alquilo recto, ramificado o cíclico con 3 a 8 átomos de carbono, fenilo y bencilo,

n ser elegido entre 2, 3 y 4,

R₄ ser elegido entre hidrógeno y guanilo,

90

R₅ ser elegido entre fenilo, nitrofenilo, metilnitrofenilo, dinitrofenilo, naftilo, nitronaftilo, quinolilo y nitroquinolilo.

Los nuevos substratos pueden ser producidos por dos distintos métodos principales.

95

1. El primer método se basa en el acoplamiento del grupo cromofórico R₅ con el aminoácido en cuestión, y luego en la construcción gradual de la estructura péptido deseada mediante el gradual acoplamiento de los aminoácidos restantes. El grupo cromofórico es usado aquí como grupo de bloqueo del grupo carboxilo que termina en C del primer aminoácido.

100

2. El otro método se basa en una construcción gradual de la estructura péptido deseada y en la sucesiva eliminación de los grupos de bloqueo usados, acc-

414252

30



plando por fin el grupo cromofórico R₅ a la estructura péptido.

En la síntesis escalonada de los derivados péptido, se han usado tales métodos de acoplamiento que son bien conocidos y que se usan corrientemente en la química de los péptidos. Tales bien conocidos grupos de bloqueo corrientemente usados en la química de los péptidos, como por ejemplo el Cbo (carbobenzoxi), MeOCbo (p-metoxicarbobenzoxi)NO₂Cbo (p-nitrocarbobenzoxi), MGbo (p-metoxifenilazo-carbobenzoxi), BOC (tercio-butiloxycarbonilo), TFA (trifluoroacetilo) o formilo son usados como grupos de bloqueo amino. El grupo alfa-carboxilo puede ser activado por transformación en derivados distintos activados, bien conocidos en la química de los péptidos y usados con frecuencia, que pueden ser aislados u originados "in situ", como por ejemplo el p-nitrofeniléster, triclorofeniléster, pentaclorofeniléster, N-hidroxisuccinimidaéster, acida ácida, anhídrido ácido, que pueden ser simétricos o asimétricos. También puede ser activado con una carbodiimida como la N,N'-diciclohexilcarbodiimida. El grupo carboxílico que termina en C en el derivado péptido amino o en el derivado aminoácido puede ser protegido esterificando, por ejemplo, en metil-, etil- o isopropiléster o mediante transformación en el derivado de anilina cromofórico, que así trabaja como grupo de bloqueo durante la construcción de la cadena del péptido. Los grupos funcionales libres que no intervienen en la reacción pueden ser protegidos de la siguiente manera durante la síntesis de los péptidos o de los derivados de péptidos :

Con el fin de bloquear el grupo arginilo delta-guanido y el grupo lisile épsilon-amino, pueden usarse los grupos de bloqueo amino corrientemente usados en la química de los péptidos, como por ejemplo NO₂, Tos (p-toluensulfonilo) o sólo protonización como protección del grupo guanido, y Cbo (carbobenzoxi), BOC (tercio-butiloxycarbonilo) o también Tos para el grupo épsilon-amino. Como protección del grupo hidroxilo en tirosina, se pueden usar los grupos de bloqueo corrientemente usados en la química de los péptidos, como por ejemplo grupos de protección benéficos y butílicos terciarios.

En la síntesis escalonada de la estructura péptido, puede realizarse una



414252

purificación sistemática mediante filtración de gel después de cada acoplamiento de un nuevo aminoácido. Para dicha filtración de gel, se emplea una columna llena de un material adecuado para la filtración del gel, por ejemplo un gel de dextrana con enlaces transversales del tipo Sephadex (R) C o
 135 IH de Pharmacia Fine Chemicals, de Uppsala, Suecia. Otro gel adecuado consiste en copolímeros de acetato de vinilo, por ejemplo del tipo Merckogel (R) OR-PVA, de A.G. E.Merck, Darmstadt, Alemania Occidental. El material de gel es empleado equilibrado con un adecuado disolvente, realizándose luego una elución con el mismo disolvente, por ejemplo metanol, etanol, acetona, di
 140 metilformamida, dimetilacetamida, dimetilsulfóxido o triamida hexametilfosfórica.

Se describirá más detalladamente la invención en los Ejemplos siguientes, que ilustran la producción de distintos substratos según la invención por síntesis escalonada. Sin embargo, estos ejemplos no limitan el alcance
 145 de la invención.

En el análisis cromatográfico en capa delgada del eluado y de los productos, se usaron placas de vidrio con gel de sílice (F 254 de A.G. E.Merck, Darmstadt, Alemania Occidental) como medio de absorción. Para el desarrollo
 de los cromatogramas en capa delgada, se usaron los sistemas disolventes siguientes :
 150

- A : n-butanol:ácido acético:agua (3:1:1)
- C : n-propanol:acetato de etilo:agua (7:1:2)
- D : n-heptano:n-butanol:ácido acético (3:2:1)
- P₁: cloroformo:metanol (9:1)

Después de cromatografiar la capa delgada, se revelaron las placas primero en luz UV (254 nm) y luego con la reacción de cloro/toluidina (ref.: G. Pataki: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure und Peptid-Chemie, Walter de Gruyter & Co., Berlín, 1966, pág. 125) como método de revelado.
 155

A menos que se diga otra cosa, todos los aminoácidos usados tienen la configuración en L y las abreviaturas tienen los significados siguientes :
 160

414252

30 A



Arg = arginina Phe = fenilalanina
Ile = isoleucina Tyr = tirosina
Leu = leucina Val = valina
Lys = lisina C-Ph.Gly = C-fenilglicina

165 Otras abreviaturas usadas en los Ejemplos :

Ac = acetilo
Ac₂O = anhídrido acético
AcOH = ácido acético
BOC = terció-butíloxicarbonilo
170 Bz = benzóilo
 Bzl = bencilo
 Bz₂O = anhídrido benzoico
 Cbo = carbobenzoxi
 DCCI = dicitclohexilcarbodiimida
175 DCHA = dicitclohexilamina
 DCU = dicitclohexilcarbamida
 DMF = dimetilformamida
 Et₃N = trietilamina
 HMPA = N, N, N', N', N'', N''' -hexametilfosfórica triamida
180 MCHO = p-metoxifenilazocarbobenzoxi
 MeOH = metanol
 NA = naftilamina
 OtBu = terció-butíloxi
 OEt = etíloxi
185 OMe = metíloxi
 OpNF = p-nitrofenoxi
 OisoPr = iso-propíloxi
 pNA = p-nitroanilida
 TFA = trifluoroacetilo
190 Tos = p-toluensulfonilo

414252

30 AB



TLC = cromatografía en capa delgada

Los geles Sephadex (R) G-15 y G-25 usados para la filtración del gel son ambos geles de dextrana con enlaces transversales y con distintos grados de enlaces transversales de Pharmacia Fine Chemicals, de Uppsala, Suecia.

195 El gel Sephadex (R) LH-20 es un gel de dextrana con enlaces transversales hidroxipropilado de Pharmacia Fine Chemicals, de Uppsala, Suecia.

Ejemplo I : N^{alpha} - Bz - Phe - Val - Arg - pNA . HCl (I)

Ejemplo I a : Cbo - Arg(NO₂) - pNA (Ia)

1) Se disolvieron 35,3 g (0,1 mol) de Cbo - Arg(NO₂)-OH seco en 200 ml de HMTA seco recién destilado a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron agitando y en condiciones libres de humedad 10,1 g (0,1 mol) de Et₃N y 24,6 g (0,15 mol) de p-nitrofenilisocianato. Después de un tiempo de reacción de 24 horas a temperatura ambiente, se vertió la mezcla de reacción, agitando, en una solución (2 litros) de bicarbonato sódico al 2%. Se filtró y lavó 3 veces el precipitado con 0,5 litros de solución de bicarbonato sódico al 2%, 2 veces con 0,2 litros de agua destilada y después 2 veces con 0,5 litros de ácido clorhídrico 0,5 N y, por fin, 5 veces con 0,2 litros de agua destilada. El producto crudo y secado fue extraído con metanol caliente, disolviéndose de este modo el producto deseado y algunos productos secundarios adicionales. El residuo insoluble, consistente en N,N'-bis p-nitrofenilcarbamida, fue separado por filtración y el filtrado fue purificado en una columna que contenía Sephadex (R) LH-20, equilibrado con MeOH.

210 29,8 g (63,0%) de Ia, p.f. 185-188° C., homogéneos según la TLC en P, y C

y $\alpha_D^{24} = -1,3^\circ$ (c = 1,1; AcOH).

2) 35,3 (0,1 mmol) de Cbo-Arg(NO₂)-OH (seco) fueron disueltos en 600 ml de tetrahidrofurano : DMF (1:1). Se añadieron 10,1 g (0,1 mol) de Et₃N, después de lo cual se enfrió la solución a -10° C. en condiciones libres de humedad. Se añadieron 13,7 g (0,1 mol) de cloroformato de isobutilo

220

414252

30



disueltos en 50 ml de tetrahidrofurano, gota a gota, a la mezola enfriada durante un período de 10 minutos y, después de otro intervalo de 10 minutos, se añadieron 16,4 g (0,1 mol) de p-nitroanilina. Después de alcanzar la temperatura ambiente, se dejó reposar la solución de la reacción durante 24 horas. Luego, se destiló en vacío el disolvente de la mezola de reacción, se digirió 3-5 veces, cada vez con agua destilada, 5% de bicarbonato de sodio, y agua destilada, después de lo cual se destiló en vacío el residuo.

Purificación : doble recristalización en MeOH. El licor madre fue filtrado con gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

23,0 g (48,5%) de Ia con los mismos datos físicos del Ejemplo anterior.

3) Se disolvió en DMF una cantidad de 35,3 g (0,1 mol) de Cbo - Arg(NO₂) - OH, se enfrió la solución a -10° C., después de lo cual se añadieron 20,6 g (0,1 mol) de DCCI y 16,4 g (0,1 mol) de p-nitroanilina. Después de un tiempo de reacción de 24 horas a temperatura ambiente, se evaporó la solución de la reacción hasta la sequedad y se digirió 3-5 veces, cada vez con agua destilada, solución de bicarbonato sódico al 5%, agua destilada, 0,5 N HCl y agua destilada. El residuo fue secado en vacío.

Purificación : filtración con gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

14,7 g (34,0%) de Ia con un p.f. 186-188° C., homogéneo según la TLC en P y C y $\alpha_D^{24} = -1,38^\circ$ (c = 1,0; AcOH).

Ejemplo I b : Cbo - Val - Arg(NO₂) - pNA (Ib)

A 20,6 g (43,5 mmoles) de Ia se añadieron 110 ml de AcOH y 110 ml de 4N HBr en AcOH en condiciones libres de humedad. Se agitó la mezola a temperatura ambiente durante 60 minutos, después de lo cual fue vertida lentamente en 750 ml de éter seco, agitándose vigorosamente todo ello y obteniéndose la precipitación de 1,5 HBr . H-Arg(NO₂)-pNA. Se decantó la fase etérica, se lavó ulteriormente 4 veces el precipitado con 250 ml de éter seco para eliminar el bromuro de bencilo que se había formado y el exceso de HBr y AcOH. Después de secar en vacío sobre P₂O₅ el bromhidrato del derivado de amino

414252

39



ácido fue obtenido con un rendimiento cuantitativo de 20,0 g.

20,0 g (43,5 mmoles) de 1,5 HBr.H-Arg(NO₂)-pNA fueron disueltos en 150 ml de DMF y enfriados a 10° C. 6,60 g (65,2 mmoles) de Et₃N fueron añadidos para liberar H-Arg(NO₂)pNA de la sal de bromhidrato. El Et₃N.HBr formado fue filtrado y al filtrado, enfriado a -10°, se añadieron 20,3 g (54,3 mmoles) de Cbo-Val-OpNP. Una vez que la solución de la reacción, después de varias horas, había adquirido la temperatura ambiente, fue enfriada nuevamente y tamponada con 2,2 g (21,7 mmoles) de Et₃N. Se repitió una vez más después de aproximadamente 3 horas el procedimiento de tamponado. Después de un tiempo total de reacción de aproximadamente 24 horas, se secó la mezcla de reacción en vacío a 40° C. El residuo fue digerido 3 veces con 100 ml de agua destilada, después de lo cual fue secado en 3 veces con 100 ml de agua destilada, secándose a continuación en vacío.

Purificación : recristalización del material crudo, 2 veces, en MeOH proporcionó 12,4 g (50%) de sustancia pura. El licor madre fue purificado mediante filtración de gel en una columna con Sephadex (R) LH-20 equilibrado con MeOH. Del eluado, se obtuvo una fracción que proporcionó otros 10,8 g de sustancia pura.

Ejemplo I c : Cbo - Phe - Val - Arg(NO₂) - pNA (I c)

Material inicial : 28,6 g (50 mmoles) de I b y 31,5 g (75 mmoles) de Cbo-Phe-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

Purificación : recristalización del material crudo efectuada 3 veces en MeOH proporcionó 14,4 g de sustancia pura según la TLC en P₁. El licor madre fue purificado mediante filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH y se obtuvieron 19,6 g de sustancia pura según TLC en P₁.

Se obtuvieron 34,0 g (94,4%) de I c de p.f. 219,5-222° C., homogéneos según TLC en P₁ y $\alpha_D^{23} = -17,1^\circ$ (c=1,0; DMF-AcOH; 99:1).

Ejemplo I d : Nalfa - Bz - Phe - Val - Arg(NO₂)-OMe (I d)

Material inicial : 30,7 (50 mmoles) de Cbo-Phe-Val-Arg(NO₂)-OMe y 16,0 g

414252

30



(75 mmoles) de Bz₂O.

Método de síntesis : se realizó la descarbobenzoxilación de Cbo-Phe-Val-Arg(NO₂)-OMe de la misma manera descrita en el Ejemplo I b.

Se disolvieron 30,0 (50 mmoles) de 1,5 HBr.H-Phe Val-Arg(NO₂)OMe en 350 ml de DMF y se enfriaron a -10, después de lo cual se añadieron 7,6 (75 mmoles) de Et₃N. Se agitó la solución en condiciones de ausencia de humedad durante 1 hora, después de cuyo tiempo se separó por filtración el Et₃N.HBr formado. Se enfrió el filtrado a -10° C. y se añadieron 16,0 (75 mmoles) de Bz₂. Después de un tiempo de reacción de aproximadamente 3 horas, cuando la solución había tomado la temperatura ambiente, fue vuelta a enfriar y fue tamponada con 2,5 g (25 mmoles) de Et₃N. Se repitió una vez más el tamponamiento después de aproximadamente 3 horas. Después de un tiempo de reacción total de aproximadamente 24 horas, se evaporó en vacío la solución. Se digirió el residuo y se secó por el procedimiento descrito en el Ejemplo I b.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 26,0 g (88,9% de I d de un p.f. de 138-141° C., homogéneos según la TLC en P₁ y D y $\frac{R_f}{D} = -39,8^\circ$ (o = 1; MeOH).

Ejemplo I e : N^{alfa} - Bz - Phe - Val - Arg(NO₂) - OH (I e)

Se disolvieron 11,7 g (20 mmoles) de I d en 200 ml de EtOH al 50% y 200 ml de 1N KOH/EtOH al 95%. Después de agitar durante 75 minutos a temperatura ambiente, se hizo pasar CO₂ gaseoso por la solución hasta que alcanzó un pH de 7. Se evaporó la solución en vacío hasta un volumen de aproximadamente 25 ml y luego se diluyó con H₂O hasta un volumen total de 500 ml. Se extrajo 4 veces la solución con EtOAc, después de lo cual se acidificó la fase acuosa con 1N HCl hasta un pH de 2,8. El ácido de benzoil-tripéptido liberado que se separó por precipitación durante la acidificación fue separado por filtración y lavado muchas veces con agua destilada. La substancia fue secada en vacío.

Purificación : doble recristalización en MeOH. El licor madre fue purificado por filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

414252

36



Se obtuvieron 10,1 g (88,5%) de I e en forma amorfa, con un peso equivalente 555,7 y homogéneos según la TLC en A y C.

Ejemplo I f : N^{alfa} - Bz - Phe - Val - Arg(NO₂) - pNA (I f)

315 1) Material inicial : 7,2 g (10 mmoles) de I c y 3,4 g (15 mmoles) de Bz₂O.
Método de síntesis : según el Ejemplo I d.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 5,2 g (75,5%) de I f de un p.f. 236-237° C., homogéneos según la TLC en P₁ y D y /alfa/ $\frac{24}{D} = -23,0^{\circ}$ (c = 1; DMF).

320 2) Material inicial : 5,7 g (10 mmoles) de I e y 2,46 g (15 mmoles) de p-nitrofenilisocianato.

Método de síntesis : según el Ejemplo I a - 1.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 5,3 g (75,5 %) de I f de un p.f. 235-237° C., homogéneos según TLC en P₁ y D y /alfa/ $\frac{24}{D} = -22,5^{\circ}$ (c = 1; DMF).

325 Ejemplo I g : N^{alfa} - Bz - Phe - Val - Arg - pNA . HCl (I)

330 Se pusieron en el recipiente de reacción de un aparato Sakakibara 345 mg (0,5 mmoles). Se condensaron en el recipiente 5 ml de fluoruro de hidrógeno seco. Después de agitar durante un tiempo de reacción de 1 hora a una temperatura de 0° C., el grupo nitro que protege la función guanidina se había separado. Entonces, se destiló en vacío el fluoruro de hidrógeno y se disolvió en DMF el residuo seco. Para transferir el derivado de fluoruro de hidrógeno del péptido a su sal de clorhidrato, se añadieron a la solución DMF 0,25 ml de HCl concentrado. Se evaporó en vacío la solución hasta la sequedad. El procedimiento de conversión fue repetido una vez más. El residuo 335 fue disuelto en 33% de AcOH.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

Se obtuvieron 275 mg (80,7 %) de I después de secar por congelación en forma de polvo amorfo con un contenido de Cl de 5,12 %, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ $\frac{23}{D} = -43,5^{\circ}$ (c = 0,69; 50 % AcOH).

340 Análisis de aminoácido : Val: 1,0; phe: 1,2; Arg: 0,99.



414252

Ejemplo II : N alfa - 3 fenilpropionil - Phe - Val - Arg - pNA . HCl (II)

N alfa - 3-fenilpropionil - Phe - Val - Arg(NO₂) - CMe (IIa)

Material inicial : 30,7 g (50 mmoles de Cbo-Phe-Val-Arg(NO₂) - CMe y 16,3 g (60 mmoles) de 3-fenilpropionil-OpNP.

345 Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH. 25,2 g (82,5 %) de IIa, homogéneos según la TLC en P₁ y C fue lo que se obtuvo.

N alfa - 3 fenilpropionil - Phe - Val - Arg(NO₂) - OH (IIb)

Material inicial : 7,1 g (11,5 mmoles) de IIa.

350 Método de síntesis : según el Ejemplo I e.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 6,5 g (93,7%) de IIb con p.e. 584,1 homogéneos según la TLC en A y C /alfa/ $\frac{24}{D} = -9,3^\circ$ (o = 1,0; MeOH).

N alfa - 3-fenilpropionil - Phe - Val Arg(NO₂) pNA (IIc)

355 Material inicial : 3 g (5 mmoles) de IIb y 1,23 (7,5 mmoles) de γ -nitrofenil isocianato.

Método de síntesis : según el Ejemplo I a - 1.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 2,65 g (66,3%) de II c, homogéneos según la TLC en P₁.

360 N alfa - 3-fenilpropionil - Phe - Val - Arg - pNA . HCl (II)

Material inicial : 179 mg (0,25 mmoles) de II c.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

365 45 mg (26,5%) de II fueron obtenidos después de secar por congelación en forma amorfa con un contenido de Cl del 4,91 %, homogéneos según la TLC en A y

/alfa/ $\frac{23}{D} = -36,7^\circ$ (o = 0,71; 50 % en AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 0,99.

H - Phe - Val - Arg - pNA . 2 HCl (III)

Material inicial : 198 mg (0,28 mmoles) de I c.

370 Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

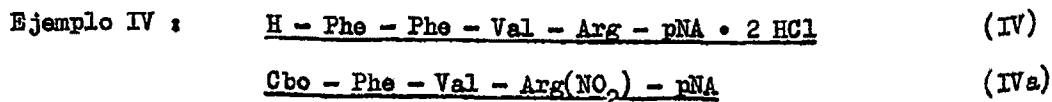


414252

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-25 en 50 % AcOH.

Se obtuvieron 170 mg (61,0 %) de III amorfo, secado por congelación, de un contenido de Cl del 11,37%, homogéneo según la TLC en A y $\alpha/D^{23} = -26,3^{\circ}$ (c = 0,61; 50 % AcOH).

375 Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 0,95; Arg: 1,0.



Material inicial : 335 mg (0,46 mmoles) de I c y 317 mg (0,75 mmoles) de Cbo - Phe - OpNP.

380 Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en DMF.

Se obtuvieron 282 mg (70,0 %) de IV a con un p.f. de 201 - 204° C., homogéneos según la TLC en P₁ y $\alpha/D^{25} = -1,02^{\circ}$ (c = 0,98; DMF).



385 Material inicial : 92,9 mg (0,107 mmoles) de IV a.

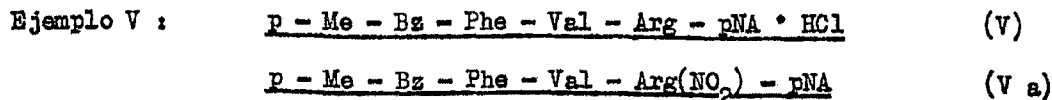
Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-25 en 50 % AcOH.

Se obtuvieron 59,5 mg (73,1 %) de IV amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl del 9,18%, homogéneos según la TLC en A y $\alpha/D^{23} = -19,7^{\circ}$

390 (c = 0,76; 50 % AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 2,2; Arg: P,98.



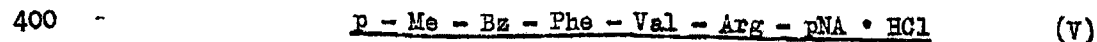
Material inicial : 155 mg (0,216 mmoles) de I c y 83,2 mg (0,324 mmoles) de

395 p-Me-Bz-OpNP, p.f. 169 - 172°.

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 69,5 mg (45 %) de Va amorfo, homogéneo, según la TLC en P₁ y $\alpha/D^{23} = -26,1^{\circ}$ (c = 0,69; DMF).



414252

30



Material inicial : 68,98 mg (0,0965 mmoles) de V a.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33 % AcOH.

405 44,5 mg (66 %) de V amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 5,01 %, homogéneos según la TLC en A y $\alpha_D^{23} = -40,8^\circ$ (c = 0,70; 50 % AcOH) fue lo que se obtuvo.

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,0; Arg: 1,0.

Ejemplo VI : N alfa - Ac - Phe - Val - Arg - pNA • HCl (VI)

N alfa - Ac - Phe - Val - Arg(NO₂) - pNA (VI a)

410 Material inicial : 233 mg (0,33 mmoles) de I c y 41 mg (0,40 mmoles) de Ac₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo I d.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 118 mg (66 %) amorfos de VI a, homogéneos según la TLC en P₁ y $\alpha_D^{23} = -3,6^\circ$ (c = 1,16; DMF).

415 N alfa - Ac - Phe - Val - Arg - pNA • HCl (VI)

Material inicial : 116 mg (0,185 mmoles) de VI a.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 20 % AcOH.

420 Se obtuvieron 90 mg (79 %) de VI amorfo, secado por congelación, con un contenido del 5,59 %, homogéneos según la TLC en A y $\alpha_D^{23} = -21,0^\circ$ c = 0,62; 50 % AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,2; Arg: 1,1.

Ejemplo VII : N alfa - n-octanóil-Phe-Val-Arg-pNA • HCl (VII)

N alfa - n-octanóil-Phe-Val-Arg(NO₂)-pNA (VIIa)

425 Material inicial : 207 mg (0,288 mmoles) de I c y 109 mg (0,41 mmoles) de éster p-nitrofenílico de ácido caprílico.

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH 20 en MeOH.

430 Se obtuvieron 172 mg (84 % de VII a amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y $\alpha_D^{23} = -6,6^\circ$ (c = 0,5; DMF).

414252

30



N alfa - n-octanoyl-Phe-Val-Arg-pNA • HCl

(VII)

Material inicial : 129,4 mg (0,182 mmoles) de VIIa.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH y Sephadex

435 (R) G-15 en 33 % AcOH.

Se obtuvieron 109 mg (85 %) de VII amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 4,96 %, homogéneo según la TLC en A y $\alpha_D^{23} = -29,50$ (c = 0,7; 50 % AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,2; Phe: 1,0; Arg: 0,95.

440 Ejemplo VIII : N alfa - ciclohexilcarbonil - Phe - Val - Arg - pHA • HCl (VIII)

N alfa - ciclohexilcarbonil - Phe - Val - Arg (NO₂) - pHA (VIIIa)

Material inicial : 233 mg (0,33 mmoles) de Ic y 100 mg (0,40 mmoles) de ácido ciclohexilcarboxílico - p-nitrofeniléster.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

445 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 117 mg (aprox. 50%) de VIIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y $\alpha_D^{23} = -10,9^{\circ}$ (c = 0,23; DMF).

N alfa - ciclohexilcarbonil - Phe - Val - Arg - pHA • HCl (VIII)

Material inicial : 48,02 mg (0,069 mmoles) de VIIIa.

450 Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 50% AcOH.

Se obtuvieron 33,7 mg (71 %) de VIII amorfo, secado por congelación, con un contenido de cloro de 5,11 %, homogéneo según la TLC en A y $\alpha_D^{23} = -32,8^{\circ}$ (c = 0,68; 50 % AcOH).

455 Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,3; Arg: 1,0.

Ejemplo IX : N alfa - Tos-Phe-Val-Arg-pNA • HCl (IX)

N alfa - Tos-Phe-Val-Arg(NO₂) - pNA (IX a)

Material inicial : 360 mg (0,5 mmoles) de Ic y 180 mg (0,95 mmoles) de p-toluensulfocloruro.

460 Método de síntesis : se disolvieron 360 mg de Ic en 1 ml de AcOH y 1 ml de

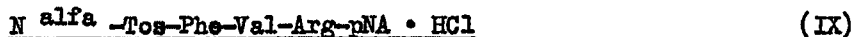
414252 30



AcOH y 1 ml de 5,6 NHB₂/AcOH en una atmósfera sin humedad y se agitaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió luego gota a gota la mezcla de reacción a éter destilado, agitando vigorosamente, obteniéndose la precipitación de 350 mg de 1,5 HBr.H-Phe-Val-Arg (NO₂)-pNA. Se decantó la fase etérica y se lavó 3 veces más con éter el precipitado. Después de secar en vacío sobre P₂O₅, se obtuvo con rendimiento cuantitativo la sal de HBr del derivado aminoácido. El derivado HBr fue disuelto en 4 ml de DMF. Se enfrió a -10° la solución y se añadieron 75 mg (0,75 mmoles) de Et₃N para liberar H-Phe-Val-Arg (NO₂)-pNA de la sal bromhídrica. El tiempo de reacción fue de 1 hora en una atmósfera libre de humedad. Se filtró el Et₃N. HBr y se enfrió a -10° C. el filtrado. Se añadieron 190 mg de p-toluensulfocloruro y se dejó adquirir lentamente la temperatura ambiente a la solución, después de lo cual, unas 3 horas más tarde, fue enfriada a -10° C. y tamponada con 25 mg (0,25 mmoles) de Et₃N. Unas 2-3 horas más tarde, se repitió una vez más el procedimiento de tamponado. Después de aproximadamente 24 horas de tiempo de reacción, se evaporó la solución hasta la sequedad a 40° C. en vacío. Se trató 3 veces el residuo con agua destilada y se secó en vacío. Se disolvió el residuo en MeOH y se purificó.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 135 mg (36,5 %) de IXa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ _D²³ = $\frac{+}{-}$ (c = 1,0; DMF).



Material inicial : 81,43 mg (0,11 mmoles) de IXa.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ig.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 20 % de AcOH. Se obtuvieron 63 mg (78,4 %) de IX amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 4,79 %, homogéneo según la TLC en A, y /alfa/ _D²³ = $\frac{+}{-}$ (c = 0,73; 50 % AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,2; Arg: 1,0.

Ejemplo X : N alfa -p-amino-Bz-Phe-Val-Arg-pNA • 2 HCl (X)

414252

30



Cbo-p-amino-Bz-Phe-Val-Arg (NO₂)-pNA (Xa)

Material inicial : 233 mg (0,33 mmoles) de Ic y 170 mg (0,44 mmoles) de Cbo-p-amino-Bz-OpNP, p.f. 169-172°.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

495 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 55 mg (20%) de Xa amorfo, homogéneo según la TLC en P_q y /alfa/ ²³_D = -30,2° (c = 0,53; DMF).

N alfa -p-amino-Bz-Phe-Val-Arg-pNA • 2 HCl (X)

Material inicial : 46,81 mg (0,056 mmoles) de Xa.

500 Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 20 % AcOH.

Se obtuvieron 15 mg (37 %) de X amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 9,42 %, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ ²³_D = -46,7° (c = 0,74; 59 % AcOH).

505 Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,0; Arg: 0,95.

Ejemplo XI : N alfa -6-aminohexanoil-Phe-Val-Arg-pNA • 2 HCl (XI)

Cbo-6-aminohexanoil-Phe-Val-Arg(NO₂)-pNA (XIa)

Material inicial : 360 mg (0,5 mmoles) de Ic y 290 mg (0,75 mmoles) de Cbo-6-ácido aminocaprónico-p-nitrofeniléster.

510 Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 398 mg (95,5 %) de XIa amorfo, homogéneo según la TLC y /alfa/ ²⁵_D = -5,7° (c = 1,1, DMF).

N alfa -6-aminohexanoil-Phe-Val-Arg-pNA • 2 HCl (XI)

515 Material inicial : 300 mg (0,361 mmoles) de XIa.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ig.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33 % AcOH.

Se obtuvieron 127 mg (48 %) de XI amorfo, secado por congelación, de un contenido de cloro de 9,68 %, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ ²³_D =

520 -32,0 (c = 0,72; 50 % AcOH).

414252 30



Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 1,0.

Ejemplo XII : H-Phe-Leu-Arg-pNA · 2 HCl (XII)

Cbo-Leu-Arg(NO₂)-pNA (XIIa)

Material inicial : 5 g (10,6 mmoles) de Ia y 4,92 g (12,7 mmoles de Cbo-
525 Leu-OpNP).

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 6,1 g (98 %) de XIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y
/alfa/ ²⁵_D = -33,5° (c = 1,0; MeOH).

530 Cbo-Phe-Leu-Arg(NO₂)-pNA (XIIb)

Material inicial : 3,6 g (6,5 mmoles) de XIIa y 3,27 g (7,8 mmoles) de
Cbo-Phe-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

535 Se obtuvieron 2,95 g (69,0 %) de XIIb amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y
/alfa/ ²⁵_D = -6,2° (c = 1,0; DMF).

H-Phe-Leu-Arg-pNA · 2 HCl (XII)

Material inicial : 124,9 mg (0,17 mmoles) de XIIb.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ig.

540 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-25 en 50 % de AcOH.

Se obtuvieron 65 mg (61 %) de XII amorfo, secado por congelación, de un con-
tenido de Cl de 11,15 %, homogéneo según TLC en A y /alfa/ ²³_D = -24,4° (c =
0,63; 50 % AcOH).

Análisis de aminoácido : Leu: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 1,0.

545 Ejemplo XIII : N alfa -Bz-Phe-Leu-Arg-pNA · HCl (XIII)

N alfa -Bz-Phe-Leu-Arg(NO₂)-pNA (XIIIa)

Material inicial : 734 mg (1 mmol) de XIIb y 272 mg (1,2 mmoles) de Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

550 Se obtuvieron 589 mg (84 %) de XIIIa de un p.f. 196-197° C., homogéneo según

414252



la TLC P₁ y D y /alfa/ ²⁵/_D = -19,1° (c = 1,0; DMF).



Material inicial : 198,5 mg (0,282 mmoles) de XIIIa.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

555 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-25 en 50 % AcOH.
Se obtuvieron 188 mg (96 %) de XIII amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 4,96 %, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ ²⁴/_D = -38,3° (c = 0,69; 50 % AcOH).

Análisis de aminoácido : Leu: 1,0; Phe: 1,0; Arg: 1,0.



Material inicial : 1 g (2,1 mmoles) de Ia y 0,98 g (2,46 mmoles) de Cbo-Ile-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

565 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.
Se obtuvieron 1,12 g (91 %) de XIVa de un p.f. 195-202° C., homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ ²⁵/_D = + 2,8° (c = 1,0; DMF).



Material inicial : 0,8 g (1,36 mmoles) de XIVa y 0,69 g (1,63 mmoles) de Cbo-Phe-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.
Se obtuvieron 445 mg (41 %) de XIVb de un p.f. 219-222°, homogéneo según la TLC en E₁ y /alfa/ ²⁵/_D = -7,1° (c = 1; DMF).



Material inicial : 166,43 mg (0,226 mmoles) de XIVb.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-25 en 50 % AcOH.

580 Se obtuvieron 95,3 mg (67 %) de XIV amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 11,17 %, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ ²³/_D =



414252

-32,0° (c = 0,63; 50 % AcOH).

Análisis de aminoácido : Ile: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 1,0.

Ejemplo XV : N alfa -Bz-Phe-Ile-Arg-pNA • HCl (XV)

N alfa -Bz-Phe-Ile-Arg(NO₂)-pNA (XVa)

585 Material inicial : 250 mg (0,34 mmoles) de XIVb y 92 mg (0,4 mmoles) de Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo I d.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 210 mg (88 %) de XVa con un p.f. de 244-245° C., homogéneo

590 según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{25}{D}$ = -22,3 (c = 1; DMF).

N alfa -Bz-Phe-Ile-Arg-pNA • HCl (XV)

Material inicial : 182,7 mg (0,26 mmoles) de XVa.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-25 en 50 % AcOH.

595 Se obtuvieron 176,9 mg (97 %) de XV amorfo, secado por congelación, de un contenido de Cl de 4,98%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ $\frac{24}{D}$ = -41,5° (c = 0,69; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Ile: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 1,1.

Ejemplo XVI : H-Phe-Phe-Arg-pNA • 2 HCl (XVI)

600 Cbo-Phe-Arg(NO₂)-pNA (XVIa)

Material inicial : 1 g (2,1 mmoles) de Ia y 1,06 g (2,46 mmoles) de Cbo-Phe-OpMP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

605 Se obtuvieron 1,25 g (96,0 %) de XVIa con un p.f. 198-204° C., homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{25}{D}$ = + 4,2° (c = 1,0; DMF).

Cbo-Phe-Phe-Arg(NO₂)-pNA (XVIb)

Material inicial : 0,9 g (1,45 mmoles) de XVIa y 0,737 g (1,74 mmoles) de Cbo-Phe-OpNP.

610 Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

414252



Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 635 mg (58 %) de XVIIb de un p.f. de 201-203° C., homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{25}{D} = -23,0^\circ$ (c = 1,0; DMF).



615 Material inicial : 196,9 mg (0,257 mmoles) de XVIIb.

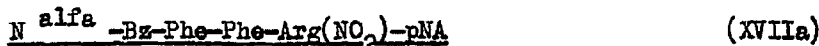
Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-25 en 50 % AcOH.

Se obtuvieron 75,8 mg (46 %) de XVI amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 10,65%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ $\frac{23}{D} =$

620 $-6,7^\circ$ (c = 0,65; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Phe: 2,0; Arg: 1,1.



Material inicial : 250 mg (0,325 mmoles) de XVIIb y 90 mg (0,312 mmoles) de

625 Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo I d.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 220 mg (92 %) de XVIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{25}{D} = -36,6^\circ$ (c = 0,95; DMF).



Material inicial : 114,6 mg (0,156 mmoles) de XVIIa.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-25 en 50 % AcOH.

Se obtuvieron 77,4 mg (68 %) de XVII amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 4,81%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ $\frac{24}{D} =$

635 $-25,5^\circ$ (c = 0,72; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Phe: 2,0; Arg: 0,97.



640 Material inicial : 480 mg (0,83 mmoles) de Ib y 530 mg (1,25 mmoles) de



414252 39

Cbo-D-Phe-OpNP de un p.f. de 126,2 - 126,6°, /alfa/ $\frac{24}{D}$ = + 24,75° (c = 1,0; DMF).

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

645 Se obtuvieron 587 mg (98 %) de XVIIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{23}{D}$ = + 18,9° (c = 2,0; DMF).



Material inicial : 153,8 mg (0,212 mmoles) de XVIIIa.

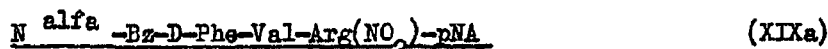
Método de síntesis : según el Ejemplo I.

650 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 20% AcOH.

Se obtuvieron 36,3 mg (28%) de XVIII amorfo, secado por congelación, de un contenido de Cl de 11,34%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ $\frac{23}{D}$ = -70,3° (c = 0,61; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 1,0.

655 Ejemplo XIX : N alfa -Bz-D-Phe-Val-Arg-pNA • HCl (XIX)

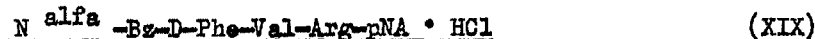


Material inicial : 244 mg (0,34 mmoles) de XVIIIa y 92 mg (0,41 mmoles) de Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo I d.

660 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 181 mg (77%) de XIX de un p.f. 211-215° C., homogéneo según la TLC en P₁, y /alfa/ $\frac{23}{D}$ = -1,36° (c = 0,8; DMF).



Material inicial : 128,3 mg (0,186 mmoles) de XIXa.

665 Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-25 en 5% AcOH.

Se obtuvieron 103,8 mg (81%) de XIX amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl del 5,15%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ $\frac{23}{D}$ = -36,9° (c = 0,68; 50% AcOH).

670 Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 0,9; Arg: 0,9.



414252

Ejemplo XX : H-Tyr-Val-Arg-pNA • HCl (XX)

Cbo-Tyr-(OBz)-Val-Arg(NO₂)-pNA (XXa)

675 Material inicial : 480 mg (0,83 mmoles) de I b y 660 mg (1,25 mmoles) de Cbo-Tyr(OBz)-OpNP de un p.f. 147,5-149,0^o y /alfa/ ²⁵/_C = -8,5^o (c = 2,0; DMF).

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 460 mg (65%) de XXa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ ²³/_D = -9,66^o (c = 1,0; DMF).

680 H-Tyr-Val-Arg-pNA • HCl (XX)

Material inicial : 144,7 mg (0,169 mmoles) de XXa.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 20% AcOH.

685 Se obtuvieron 65,4 mg (62%) de XX amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 11,20%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ ²³/_D = -29,8^o (c = 0,63; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Tyr: 1,2; Arg: 1,0.

Ejemplo XXI : N alfa -Bz-Tyr-Val-Arg-pNA • HCl (XXI)

N alfa -Bz-Tyr-Val-Arg(NO₂)-pNA (XXIa)

690 Material inicial : 246 mg (0,287 mmoles) de XXa y 65 mg (0,29 mmoles) de Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo I d.

695 El grupo Bz que protege la tirosina-OH es hasta cierto punto disociado durante el tratamiento con HBr. Por consiguiente, el rendimiento es bajo y consiste aparentemente en XXIa y N alfa -Bz-Tyr (OBz)-Val-Arg(NO₂)-pNA.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

193 mg (81%) de un producto amorfo que revela 2 sustancias según la TLC en P₁ (véase anteriormente).

N alfa -Bz-Tyr-Val-Arg-pNA • HCl (XXI)

700 Material inicial : 138,9 mg de XXIa y N-Bz-Tyr(OBz)-Val-Arg(NO₂)-pNA.

414252



Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 50% AcOH.

705 Se obtuvieron 75,4 mg de XXI amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 5,3%, homogéneo según la TLC en A, $\alpha_D^{23} = -34,7^\circ$ (c = 0,7; 50 % AcOH).

Análisis de aminoácido : Val : 1,0; Tyr : 1,2; Arg : 1,0.

Ejemplo XXII : N^{alfa}-4-aminoetilciclohexilcarbonil-Phe-Val-Arg-pNA*2 HCl (XXII)
Cbo-4-aminoetilciclohexilcarbonil-Phe-Val-Arg-pNA (XXIIa)

710 Material inicial : 268 mg (0,65 mmoles) de Cbo-4-aminoetilciclohexilcarbonil-OpNP y 360 mg (0,5 mmoles) de I c.

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

715 Se obtuvieron 265 mg (62% de XXIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y $\alpha_D^{23} = -8,5^\circ$ (c = 0,51; DMF).

N^{alfa}-4-aminoetilciclohexilcarbonil-Phe-Val-Arg-pNA*2 HCl (XXII)

Material inicial : 137 mg (0,16 mmoles) de XXIa.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

720 Se obtuvieron 82,2 (68,5%) de XXII amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 9,37%, homogéneo según la TLC en A y $\alpha_D^{25} = -35,2^\circ$ (c = 0,73; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 1,0.

Ejemplo XXIII : N^{alfa}-2-ciclohexilacetil-Phe-Val-Arg-pNA*HCl (XXIII)

N^{alfa}-2-ciclohexilacetil-Phe-Val-Arg (NO₂)-pNA (XXIIIa)

725 Material inicial : 197 mg (0,75 mmoles) de ciclohexilacetil-OpNP y 331 mg (0,46 mmoles) de Ic.

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

730 Se obtuvieron 205 mg (63%) de XXIIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y $\alpha_D^{23} = -5,0^\circ$ (c = 0,5; DMF).



414252

N alfa -2-ciclohexilacetil-Phe-Val-Arg-pNA • HCl

(XXIII)

Material inicial : 173 mg (0,244 mmoles) de XXIIIa.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ig.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

735 Se obtuvieron 139 mg (81%) de XXIII amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 5,01%, homogéneo según la TLC en A y $\alpha_D^{23} = -32,0^\circ$ ($c = 0,35$; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 1,0.

Ejemplo XXIV : 4-aminobutiril-Phe-Val-Arg-pNA • 2 HCl

(XXIV)

740

Cbo-4-aminobutiril-Phe-Val-Arg-(NO₂)-pNA

(XXIVa)

Material inicial : 234 mg (0,65 mmoles) de Cbo-4-amino-butiril-OpNP y 360 mg de Ic (0,5 mmoles).

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

745 Se obtuvieron 297 mg (74%) de XXIVa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y $\alpha_D^{23} = -5,0^\circ$ ($c = 0,6$; DMF).

4-aminobutiril-Phe-Val-Arg-pNA • 2 HCl

(XXIV)

Material inicial : 291 mg (0,362 mmoles) de XXIVa.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

750 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

Se obtuvieron 167 mg (66%) de XXIV amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 10,05%, homogéneo según la TLC en A y $\alpha_D^{23} = -35,3^\circ$ ($c = 0,72$; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Val : 1,0; Phe : 1,0; Arg : 1,1.

755 Ejemplo XXV : 2-(4-aminofenil)-acetil-Phe-Val-Arg-pNA • 2 HCl

(XXV)

2-(4-Cbo-aminofenil)-acetil-Phe-Val-Arg(NO₂)-pNA

(XXVa)

Material inicial : 200 mg (0,278 mmoles) de Ic y 152 mg (0,371 mmoles) de 2-(4-aminofenil)-acetil-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

760 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

414252



1973

Se obtuvieron 201 mg (85%) de XXVa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ ²⁴_D = -4,3° (c = 0,5; DMF).



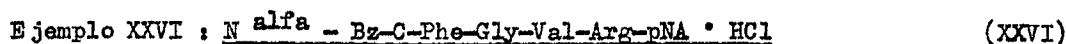
Material inicial : 97,5 mg (0,114 mmoles) de XXVa.

765 Método de síntesis : según el Ejemplo Ig.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

Se obtuvieron 43,5 mg (51%) de XXV amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 9,47%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ ²³_D = -33,0° (c = 0,75; 50% AcOH).

770 Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 1,1.

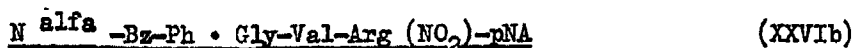


Material inicial : 230 mg (0,568 mmoles) de Cbo-C-Ph • Gly-OpNP y 250 mg (0,437 mmoles) de Ib.

775 Método de síntesis : según el Ejemplo Ic.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 292 mg (95%) de XXVIA amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ ²⁴_D = + 8,2° (c = 0,50; DMF).



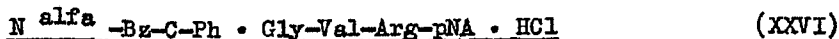
780 Material inicial : 290 mg (0,41 mmoles) de XXVIA y 130 mg (0,575 mmoles) de Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 211 mg (76%) de XXVIb amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y

785 /alfa/ ²³_D = + 10,4° (c = 0,51; DMF).



Material inicial : 200 mg (0,296 mmoles) de XXVIb.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

790 Se obtuvieron 186 mg (95%) de XXVI amorfo, secado por congelación, con un con-

414252



tenido de Cl de 5,25%, homogéneo según la TLC en A y $\alpha_D^{25} = -27,0^\circ$
($c = 0,67$; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; C-Ph • Gly: 1,2; Arg: 0,9.

Ejemplo XXVII : N alfa -Bz-Phe-Phe-Val-Arg-pNA • HCl (XXVII)

795 N alfa -Bz-Phe-Phe-Val-Arg(NO₂)-pNA (XXVIIa)

Material inicial : 141 mg (0,163 mmoles) de IVa y 90 mg (0,4 mmoles) de Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

800 Se obtuvieron 114 mg (84%) de XXVIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y
 $\alpha_D^{24} = -0,75^\circ$ ($c = 1,2$; DMF).

N alfa -Bz-Phe-Phe-Val-Arg-pNA • HCl (XXVII)

Material inicial : 71 mg (aprox. 0,087 mmoles) de XXVIIa.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ig.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

805 Se obtuvieron 47 mg (60%) de XXVII amorfo, secado por congelación, con un
contenido de Cl de 4,23%, homogéneo según la TLC en A.

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 2,3; Arg: 1,0.

Ejemplo XXVIII : N alfa -Bz-DL-C-Ph • Gly-Val-Arg-pNA • HCl (XXVIII)

Cbo-DL-C-Ph-Gly-Val-Arg(NO₂)-pNA (XXVIIIa)

810 Material inicial : 285 mg (0,5 mmoles) de Ib y 285 mg (0,7 mmoles) de Cbo-
DL-C-Ph • Gly-OpNP con p.f. 107-108° C.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ic.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 353 mg (81%) de XXVIIIa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁.

815 N alfa -Bz-DL-C-Ph • Gly-Val-Arg(NO₂) • pNA (XXVIIIb)

Material inicial : 285 mg (0,403 mmoles) de XXVIIIa y 181 mg (0,8 mmoles) de
Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

820 Se obtuvieron 226 mg (83%) de XXVIIIb amorfo, homogéneo según la TLC en P₁.

414252



(XXVIII)

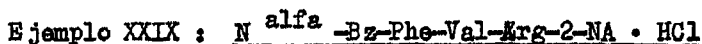
Material inicial : 101 mg (0,15 mmoles) de XXVIIIb.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

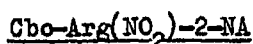
Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

825 Se obtuvieron 61 mg (61%) de XXVIII amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 5,21%, homogéneo según la TLC en A.

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; C-Ph • Gly: 1,2; Arg: 0,9.



(XXIX)



(XXIXa)

830 Material inicial : 3,6 g (10 mmoles) de Cbo-Arg (NO₂)-OH y 1,72 g (12 mmoles) de 2-naftilamina.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ia-2.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 4,05 g (84%) de XXIX amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y

835 /alfa/ $\frac{23}{D}$ = + 7,4° (c = 1,0; DMF).



(XXIXb)

Material inicial : 1,5 g (3,1 mmoles) de XXIXa y 1,38 g (3,7 mmoles) de Cbo-Val-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo I b.

840 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 1,66 g (95%) de XXIXb parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{22}{D}$ = -6,0° (c = 1,01; DMF).



(XXIXc)

Material inicial : 1,65 g (2,84 mmoles) de XXIXb y 1,43 g (3,4 mmoles) de

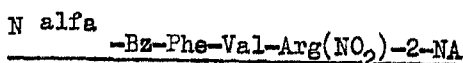
845 Cbo-Phe-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo I c.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 1,55 g (75% de XXIXc amorfo, homogéneo según TLC en P₁ y /Alfa/ $\frac{22}{D}$ = -10,9° (c = 1,01; DMF).

850



(XXIXd)

414252

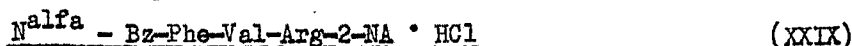


Material inicial : 1,15 g (1,58 mmoles) de XXIXc y 465 mg (2,05 mmoles) de Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo I d.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

855 Se obtuvieron 0,89 g (80,3 %) de XXIXd parcialmente cristalino, homogéneo según TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{20}{D}$ = -31,1° (c = 1,01; DMF).



Material inicial : 620 mg (0,89 mmoles) de XXIXd.

Método de síntesis : según el Ejemplo I g.

860 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 50% AcOH.

Se obtuvieron 385 mg (63%) de XXIX amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 5,12%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ $\frac{22}{D}$ = -53,8° (c = 0,71; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 1,0.

865 Ejemplo XXX : N^{alfa} -Bz-Phe-Val-Arg-1-nitro-2-NA • HCl (XXX)



Material inicial : 3,6 g (10 mmoles) de Cbo-Arg (NO₂)-OH y 2,26 g (12 mmoles) de 1-nitro-2-naftilamina.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ia-2.

870 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 3,85 g (73,1%) de XXXa amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{19}{D}$ = -11,8° (c = 1,0; DMF).



875 Material inicial : 950 mg (1,8 mmoles) de XXXa y 825 mg (2,2 mmoles) de Cbo-Val-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 0,9 g (80%) de XXXb parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{22}{D}$ = + 1,05° (c = 1,0; DMF).

880 - Cbo-Phe-Val-Arg(NO₂)-1-nitro-2-NA (XXXc)

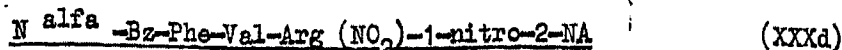
414252^u

Material inicial : 800 mg (1,27 mmoles) de XXXb y 640 mg (1,52 mmoles) de Cbo-Phe-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ic.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

885 Se obtuvieron 785 mg (79,9 %) de XXXc amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{22}{D}$ = -7,0° (c = 1,02; DMF).



Material inicial : 680 mg (0,88 mmoles) de XXXb y 260 mg (1,15 mmoles) de Bz₂O.

890 Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 480 mg (73%) de XXXd amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{24}{D}$ = -31,4° (c = 0,9; DMF).



895 Material inicial : 480 mg (0,65 mmoles) de XXXd.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ig.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 33% AcOH.

Se obtuvieron 268 mg (57%) de XXX amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 4,80%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ $\frac{22}{D}$ = -39,7° (c = 0,73; 50% AcOH).

Ejemplo XXXI : N alfa -Bz-Phe-Val-Arg-4-nitro-1-NA · HCl (XXXI)



Material inicial : 3,6 g (10 mmoles) de Cbo-Arg(NO₂)-OH y 2,26 g (12 mmoles) de 4-nitro-1-naftilamina.

905 Método de síntesis : según el Ejemplo Ia-2.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 3,61 g (60%) de XXXa parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ $\frac{22}{D}$ = -11,4° (c = 1,01; DMF).



910 Material inicial : 650 mg (1,23 mmoles) de XXXIa y 550 mg (1,45 mmoles) de

414252



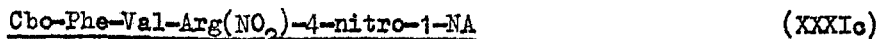
30

Cbo-Val-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ib.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 460 mg (60%) de XXXIb amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ _D²³ = + 0,9° (c = 0,55; DMF).

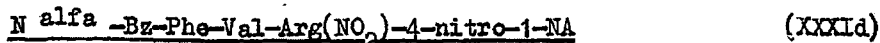


Material inicial : 450 mg (0,72 mmoles) de XXXIb y 365 mg (0,86 mmoles) de Cbo-Phe-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ic.

920 Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 500 mg (90%) de XXXIc parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ _D²⁴ = -6,0° (c = 1,0; DMF).

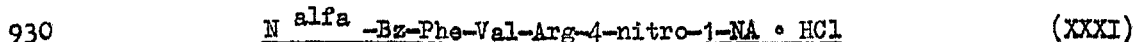


Material inicial : 490 mg (0,633 mmoles) de XXXIc y 180 mg (0,80 mmoles) de Bz₂O.

Método de síntesis : según el Ejemplo Id.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

Se obtuvieron 400 mg (84,7%) de XXXId amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y /alfa/ _D²⁰ = -31,0° (c = 1,0; DMF).



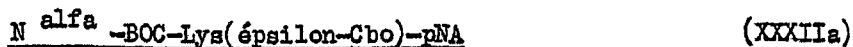
Material inicial : 380 mg (0,51 mmoles) de XXXId.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ig.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 50% AcOH.

Se obtuvieron 303 mg (81%) de XXXI amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 4,79%, homogéneo según la TLC en A y /alfa/ _D²² = -37,7° (c = 0,74; 50% AcOH).

Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 1,1; Arg: 0,9.

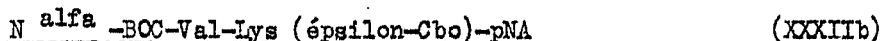


940 Se disolvieron 6,3 g (11,2 mmoles) de N alfa -BOC-Lys (épsilon Cbo)-OH • DCHA

414252



en 40 ml de HMPTA seco, recién destilado, a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 5 g (30,5 mmoles) de p-nitrofenilisocianato en porciones, agitando y en atmósfera exenta de humedad. Después de 24 horas a temperatura ambiente, se trató la mezcla de reacción de acuerdo con la descripción del Ejemplo Ia. Fueron productos secundarios de la reacción la N,N'-bis-p-nitro-fenilcarbamida y la N-p-nitrofenil-N,N'-díciclohexilcarbamida, escasamente solubles en MeOH. Se purificó mediante filtración de gel en una columna con Sephadex (R) LH-20, equilibrado con MeOH. Se obtuvieron 4,17 g (74,5%) de XXXIIa parcialmente cristalino, homogéneo según la TLC en P₁ y $\frac{R_f}{D} = + 1,7^\circ$ (c = 1,0; DMF).



Se añadieron 10 ml de ácido trifluoroacético recién destilado a 2,20 g (4,4 mmoles) de XXXIIa en una atmósfera exenta de humedad. Después de agitar durante 60 minutos a temperatura ambiente, se vertió la solución de reacción en 150 ml de éter seco agitando vigorosamente. Esto se tradujo en la precipitación de CF₃COOH·H-Lys(épsilon-Cbo)-pNA en forma de aceite que endureció al enfriarse. Se decantó la fase etérea y se trató el precipitado otras 3 veces con 75 ml de éter seco. Después de secar en vacío sobre NaOH y P₂O₅, se obtuvo la sal de trifluoroacetato del derivado de lisina con rendimiento cuantitativo (2,25 g).

Se disolvieron 2,25 g (4,4 mmoles) de CF₃COOH · H-Lys(épsilon-Cbo)-pNA en 10 ml de DMF y se enfriaron a -10° C. Se añadieron 0,75 ml (5,5 mmoles) de Et₃N para liberar el derivado de aminoácido de su sal de trifluoroacetato y después 2,0 g (5,5 mmoles) de BOC-Val-OpNP. Cuando, después de algunas horas, la solución de la reacción había adquirido la temperatura ambiente, volvió a ser enfriada y fue tamponada con 0,31 ml (2,2 mmoles) de Et₃N. El tamponado fue repetido otra vez después de aproximadamente 2 horas. Después de un tiempo de reacción de 24 horas, se evaporó la solución hasta la sequedad y en vacío a cerca de 40° C. Se trató el residuo 3 veces con 20 ml de agua destilada y se secó en vacío.

414252



Se disolvió el producto crudo en MeOH y se purificó mediante filtración de gel en una columna con Sephadex (R) LH-20 equilibrado con MeOH. Una fracción, obtenida del eluado, produjo 2,12 g (80,3%) de XXXIIb, homogéneo según la TLC en P₁ y C, y con $\alpha_D^{22} = -1,9^\circ$ (c = 1,0; DMF).

975 BOC-Phe-Val-Lys(épsilon-Cbo)-pNA (XXXIIo)

Material inicial : 0,85 g (1,42 mmoles) de XXXIIb y 0,77 g (2,0 mmoles) de BOC-Phe-OpNP.

Método de síntesis : según el Ejemplo XXXIIb.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) LH-20 en MeOH.

980 Se obtuvieron 0,84 g (79,3%) de XXXIIc amorfo, homogéneo según la TLC en P₁ y $\alpha_D^{23} = -9,3^\circ$ (c = 1,02; DMF).

N alfa -Bz-Phe-Val-Lys(épsilon-Cbo)-pNA (XXXIIId)

Material inicial : 600 mg (0,804 mmoles) de XXXIIc y 280 mg (1,25 mmoles) de Bz₂O.

985 Método de síntesis : descarboniloxilación de XXXIIc, ejecutada de manera análoga al método del Ejemplo XXXIIb.

Se disolvieron 608 mg de CF₃COOH · H-Phe-Val-Lys(épsilon-Cbo)-pNA en 10 ml de DMF y se enfriaron a -10°, después de lo cual se añadieron 113 ml (0,8 mmoles) de Et₃N para liberar la sal de la forma péptido amina. Se añadieron

990 a la solución 280 mg (1,25 mmoles) de Bz₂O a una temperatura de -10° C., después de lo cual fue tamponada y tratada de acuerdo con el Ejemplo XXXIIb. La filtración de gel del producto crudo en una columna con Sephadex (R) LH-20 en MeOH rindió 460 mg según la TLC en P₁ y C y con $\alpha_D^{24} = -22,8^\circ$ (c = 0,99; DMF).

995 N alfa -Bz-Phe-Val-Lys-pNA · HCl (XXXII)

Material inicial : 280 mg (0,373 mmoles) de XXXII.

Método de síntesis : según el Ejemplo Ig.

Purificación : filtración de gel sobre Sephadex (R) G-15 en 50% AcOH.

Se obtuvieron 172 g (71%) de XXXII amorfo, secado por congelación, con un contenido de Cl de 5,39%, homogéneo según la TLC en A y $\alpha_D^{22} = -36,2^\circ$

414252



(c = 0,67; 50% AcOH).

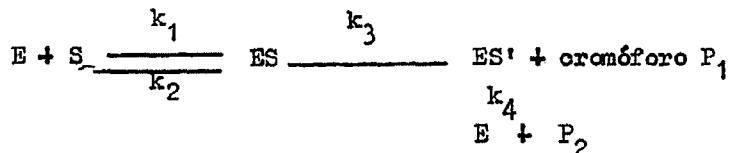
Análisis de aminoácido : Val: 1,0; Phe: 0,9; Lys: 1,1.

Los substratos producidos según los Ejemplos fueron empleados para la determinación de distintas enzimas de acuerdo con lo siguiente :

1005 El principio de la determinación se basa en el hecho de que el producto formado por la hidrólisis enzimática revela un espectro UV que está enteramente separado del espectro del substrato. Así, el substrato según el Ejemplo I N alfa -Bz-Phe-Val-Arg-pNA • HCl tiene un máximo de absorción en 303 nm con un coeficiente de extinción molar de 12900. La absorción del substrato es insignificante en 405 nm. La p-nitroanilina (pNA), que se forma en el 1010 substrato durante la hidrólisis enzimática, tiene un máximo de absorción en 380 nm con un coeficiente de extinción molar de 13200, que en 405 nm ha sido reducido solamente a 9620.

1015 Por consiguiente, midiendo espectrofotométricamente en 405 nm, es posible seguir fácilmente el grado de la hidrólisis enzimática proporcional a la cantidad de p-nitroanilina formada. El exceso de substrato presente no interfiere con la medición en esa longitud de onda. Las circunstancias son casi idénticas para los substratos restantes de la invención; razón por la cual las mediciones espectrofotométricas fueron realizadas todas a 405 nm.

1020 La reacción enzimática puede ser representada esquemáticamente de la siguiente manera :



1025

E = enzima

S = substrato

ES = complejo enzima-substrato

P₁ y P₂ = productos

1030 k₁, k₂, k₃ y k₄ = constantes de velocidad

414252



Constante de disociación para ES = $\frac{k_2}{k_1} = K_m$ (constante de Michaelis)

Si (S) (E) y $k_4 = k_3$, vale lo siguiente :

$$K_m = \frac{(E) - (ES)}{(ES)} \times (S) \text{ ----- (1)}$$

La velocidad a la cual se forma el cromóforo P₁ : $v = k_3 \times (ES)$

1035
$$v = \frac{k_3 \times (E) \times (S)}{K_m + (S)} \text{ ----- (2)}$$

Cuando todo E está enlazado con S, (ES) = (E) y

$$v = v_{max} = k_3 \times (E) \text{ ----- (3)}$$

Ecuación de Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \times \frac{1}{(S)} + \frac{1}{v_{max}} ; \text{ ----- (4)}$$

1040 Como es evidente por la ecuación (2), las constantes K_m y k_3 determinan la eficiencia del substrato de enzima para una determinada enzima. Para determinar estas constantes, el procedimiento es en principio el siguiente :

se mezclan la enzima y el substrato en una solución tampón y se sigue espectrofotométricamente la reacción durante 5 minutos. Se varía la concentración

1045 del substrato (S) mientras que se mantiene constante la concentración de enzima (E) de cada substrato. La extinción (OD) es marcada como función del

tiempo. Con la curva obtenida de este modo, la tangente (= diferencia de extinción por min., OD/min., con la cual puede calcularse la cantidad μ mol

formada p-NA/min (v)) indica en el momento cero la velocidad inicial de la

1050 reacción, v. Si $\frac{1}{v}$ es marcado contra $\frac{1}{(S)}$ K_m y v_{max} (de la ecuación (4)) son obtenidos del diagrama. K_m y $k_3 (= \frac{v_{max}}{(E)})$ para la trombina y distintos substratos de enzima están indicados en la Tabla 1 y para la tripsina en la Tabla 2.

Los datos referentes a K_m y k_3 faltan en los casos en los que no se han determinado los valores, o cuando los valores no pudieron calcularse por no

1055 haberse obtenido relación lineal alguna entre $\frac{1}{v}$ y $\frac{1}{(S)}$.

Una valoración aproximada de la relación enzima-substrato para distintos substratos puede obtenerse comparando la cantidad de p-nitroanilina formada por min. y por ml a la misma concentración de los substratos. Esto se indica

414252



1060 en la Tabla 3 para la trombina, en la Tabla 4 para la tripsina, en la Tabla 5 para la enzima Reptilase (R), que es una enzima obtenida de Bothrops atrox y afin en su acción a la trombina, y en la Tabla 6 para la plasmina.

Se obtienen con la trombina condiciones óptimas para la amidólisis del substrato según el Ejemplo I con un pH de 8,2 con una fuerza iónica de 0,13-0,15 y a una temperatura de 37-40° C.

1065 Las letras NIH usadas en las Tablas se refieren a las unidades del National Institute of Health (Instituto Nacional de Sanidad). La unidad de tripsina es igual a la hidrólisis de una μmol de N^{alfa}-tosil-arginina-metiléster clorhidrato (TAME) por minuto a 25° C. y a un pH de 8,1 en presencia de 0,01 M iones de calcio y la tripsina fue obtenida de la Worthington
1070 Biochemical Corporation, Freehold, N.J., USA. La plasmina fue obtenida de AB Kabi, Estocolmo, Suecia, y 1 mg era igual a 3 unidades de caseína (CU).

Tabla 1. Actividad a la trombina, K_m y k_3

| | Substrato | Conc. del substrato ($\mu\text{mol/l}$) | Conc. de la enzima (NIH/ml) | $K_m \times 10^4$ (mol/l) | $k_3 \times 10^4$ ($\mu\text{mol}/\text{min.}, \text{NIH}/\text{ml}$) |
|------|-----------|---|-----------------------------|---------------------------|---|
| 1075 | BAPNA | 250-666 | 50 | 6 | 11 |
| | I | 19,3-89,6 | 0,5 | 1,62 | 1340 |
| | II | 28,2-94,0 | 5 | 0,8 | 50 |
| | VIII | 19,3-89,6 | 0,5 | 0,55 | 360 |
| 1080 | XII | 31,8-106,0 | 5 | 3,91 | 110 |

Tabla 2. Actividad a la tripsina, K_m y k_3

| | Substrato | Conc. del substrato ($\mu\text{mol/l}$) | Conc. de la enzima (NIH/ml) | $K_m \times 10^4$ (mol/l) | $k_3 \times 10^4$ ($\mu\text{mol}/\text{min.}, \text{NIH}/\text{ml}$) |
|------|-----------|---|-----------------------------|---------------------------|---|
| 1085 | BAPNA | 255-666 | 75 | 16 | 8,3 |
| | I | 19,0-88,2 | 3 | 0,31 | 110 |
| | II | 28,2-94,0 | 3 | 1,01 | 112 |
| | VIII | 19,0-88,2 | 3 | 0,31 | 98 |
| | XII | 31,8-106,0 | 3 | 0,89 | 60 |

4142520

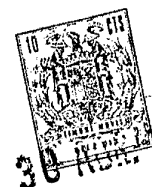


1090 Tabla 3. Actividad a la trombina.

| | Substrato | Conc. del sub- trato rmoles por ml | Conc. de enzima unidades NIH por ml | p-nitroanilina forma- da rmoles por min. y por ml |
|------|-----------|--|---|---|
| | BAPNA | 333,0 | 50,0 | 1,04 |
| 1095 | I | 64,6 | 0,417 | 6,0 |
| | VI | 67,4 | " | 0,3 |
| | VIII | 65,4 | " | 2,7 |
| | IX | 66,4 | " | 0,5 |
| | X | 58,2 | " | 1,7 |
| 1100 | XI | 65,1 | " | 0,2 |
| | XVIII | 66,9 | " | 5,6 |
| | XIX | 66,2 | " | 0,3 |
| | XX | 67,6 | " | 0,2 |
| | XXI | 65,6 | " | 1,7 |
| 1105 | XXII | 65,7 | " | 2,0 |
| | XXIV | 66,6 | " | 0,4 |
| | XXV | 66,4 | " | 0,6 |
| | XXVI | 64,7 | " | 1,4 |
| | XXXII | 69,0 | " | 0,1 |

1
1

414252



1110 Tabla 4. Actividad a la tripsina.

| | Substrato | Conc. del sub- trato nmoles por ml | Conc. de enzima unidades por ml | p-nitroanilina formada nmoles por min. y por ml |
|------|-----------|--|------------------------------------|---|
| | BAPNA | 333,0 | 2,08 | 6,1 |
| 1115 | I | 66,7 | 0,0833 | 16,3 |
| | V | 66,2 | " | 12,9 |
| | VI | 67,4 | " | 11,1 |
| | VIII | 65,4 | " | 13,7 |
| | IX | 66,4 | " | 6,8 |
| 1120 | X | 58,2 | " | 13,1 |
| | XI | 65,1 | " | 1,6 |
| | XVIII | 66,9 | " | 14,1 |
| | XIX | 66,2 | " | 5,5 |
| | XX | 67,6 | " | 6,2 |
| 1125 | XXI | 65,6 | " | 14,0 |
| | XXII | 65,7 | " | 6,2 |
| | XXIII | 67,1 | " | 5,9 |
| | XXIV | 66,6 | " | 6,2 |
| | XXV | 66,4 | " | 10,9 |
| 1130 | XXVI | 64,7 | " | 23,7 |
| | XXXII | 69,0 | " | 2,9 |

414252



Tabla 5. Actividad a la Reptilase (R).

| | Substrato | Conc. del substrato nmoles por ml | Conc. de enzima unidades por ml | p-nitroanilina formada nmoles por min. y ml |
|------|-----------|--------------------------------------|------------------------------------|--|
| 1135 | I | 66,7 | 0,5 | 4,4 |
| | II | 66,7 | " | 3,0 |
| | XIII | 66,7 | " | 4,6 |
| | XV | 66,7 | " | 2,2 |

Tabla 6. Actividad a la plasmina.

| | Substrato | Conc. del substrato nmoles por ml | Conc. de enzima unidades CU por ml | p-nitroanilina formada nmoles por min. y ml | |
|-------|-----------|--------------------------------------|--|--|-----|
| 1140 | I | 66,7 | 0,167 | 5,6 | |
| | V | 66,2 | " | 6,2 | |
| | VI | 67,4 | " | 4,1 | |
| | 1145 | VIII | 65,4 | " | 7,6 |
| | | IX | 66,4 | " | 3,4 |
| | | X | 58,2 | " | 2,7 |
| | | XI | 65,1 | " | 4,7 |
| | XVIII | 66,9 | " | 5,3 | |
| 1150 | XIX | 66,2 | " | 2,1 | |
| | XX | 67,6 | " | 2,1 | |
| | XXI | 65,6 | " | 3,4 | |
| | XXII | 65,7 | " | 2,2 | |
| | XXIII | 67,1 | " | 5,4 | |
| | 1155 | XXIV | 66,6 | " | 2,5 |
| XXV | | 66,4 | " | 4,3 | |
| XXVI | | 64,7 | " | 6,2 | |
| XXXII | | 69,0 | " | 5,7 | |

414252



Las Tablas 1 - 6 demuestran claramente las ventajas del sustrato de enzimas de la invención en comparación con el sustrato de amida antes usado para la tripsina (BAPNA). Debido a su mayor sensibilidad, los nuevos sustratos permiten la determinación de pequeñas cantidades de enzima sin poner en peligro la exactitud de la determinación. Desde un punto de vista clínico, esto es muy importante ya que simplifica la recogida de muestras.

La coagulación de la sangre es un proceso muy complicado en el cual la transformación de fibrinógeno en fibrina es regulado enzimáticamente por la trombina. Varios de los otros factores de coagulación de la sangre están relacionados de la misma manera con la trombina mediante reacciones. Los sustratos de enzimas de la invención proporcionan una posibilidad de determinación de estos factores de coagulación.

La determinación siguiente de la antitrombina se basa en principio en el hecho de añadirse en exceso a una muestra de plasma una cantidad conocida de trombina. La antitrombina libre en la sangre está ligada a la trombina añadida y la trombina en exceso es determinada luego mediante el sustrato de enzima, después de lo cual puede calcularse la cantidad de antitrombina que reacciona.

Determinación de la antitrombina.

Se desfibrina y centrifuga sangre venosa. Luego se toman 0,5 ml de plasma de la misma y se diluyen con 2 ml de una solución-tampón de trisimidazol. Luego se incuban 0,1 ml de una solución acuosa de trombina (10 NIH = National Institute of Health (Instituto Nacional de Sanidad)) con 0,25 ml de esta solución de plasma durante exactamente 5 minutos a una temperatura de 37 - 40° C. A continuación, se añade 1 ml de una solución-tampón precalentada y 0,25 ml de una solución acuosa de sustrato de enzima (1 mg/ml) y se incuba la mezcla durante exactamente 1 minuto a una temperatura de 37 - 40° C. Luego se interrumpe la reacción con 0,25 ml de ácido acético concentrado y se lee la extinción a 405 nm en un espectrofotómetro.

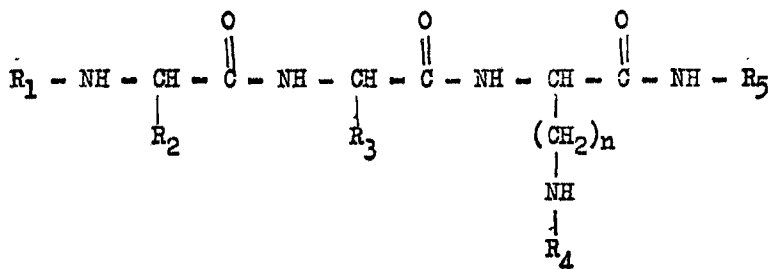
414252



373

REIVINDICACIONES

1190 1.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN NUEVO SUBSTRATO PARA USO DIAGNOSTICO ALTAMENTE SENSIBLE A LA TROMBINA Y OTRAS ENZIMAS PROTEOLITICAS DEL TIPO PEPTIDO PEPTIDOHIDROLASAS, representado por la formula general:



1195 o sus sales, pudiéndose elegir R₁ entre hidrógeno, un acilo con 1-12 átomos de C, un omega-aminoacilo con 1-12 átomos de C, un ciclohexilcarbonilo, un omega-ciclohexilacilo, 4-aminostil-ciclohexilcarbonilo, benzofilo, benzofilo sustituido por ejemplo con uno o más átomos de halógeno, grupos metilo, amino o fenilo, etc., un omega-fenilacilo con 1-6 átomos de C en la parte de acilo, donde el anillo del fenilo puede estar sustituido; bencensulfonilo, 4-toluen sulfonilo y N alfa-benzofil-fenilalanilo;

1200 R₂ puede ser elegido entre fenilo, bencilo, 4-hidroxibencilo, 4-metoxibencilo, y 4-metilbencilo;

R₃ puede ser elegido entre un alquilo recto, ramificado o cíclico con 3-8 átomos de C, fenilo o bencilo;

n puede ser elegido entre 2,3 y 4;

1205 R₄ puede ser elegido entre hidrógeno y guanilo;

R₅ puede ser elegido entre fenilo, nitrofenilo, metilnitrofenilo, dinitrofenilo, naftilo, nitronaftilo, quinolilo y nitroquinililo,

caracterizado por llevarse a efecto un acoplamiento gradual de los aminoácidos necesarios con la estructura péptido deseada, utilizando métodos de acoplamiento y grupos protectores corrientes, acoplándose el grupo cromofórico a la estructura péptido final o bien al primer aminoácido en cuestión, usándose luego el grupo cromofórico como grupo protector.

1210

Handwritten signature or mark.

414252



1215

2ª.- "PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE UN NUEVO SUBSTRATO PARA USO DIAGNOSTICO
ALTAMENTE SENSIBLE A LA TROMBINA Y OTRAS ENZIMAS PROTEOLITICAS DEL TIPO PEP
TIDO PEPTIDOHIDROLASAS". - - - - -

Consta la presente memoria descriptiva de cuarenta y tres folios nume-
rados y mecanografiados en una sola cara.

Madrid, 30 ABR. 1973

AKTIEBOLAGET BOFORS,
P.p.

PAH

PAH