

420700  
31 AGO. 1974

P.- 58.424

H 0073/F274

Int. Cl. C07C/A61K
--------------------

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT

entidad alemana

establecida en 6230 Frankfurt/Main 80, República Federal  
Alemana

por: "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE DERIVADOS DEL  
INHIBIDOR DE TRIPSINA-CALICREINA BASICO OBTENIDO  
DE ORGANOS DE MAMIFEROS"

(Clase Internacional C12k)

En diferentes órganos de mamíferos, especialmente en pulmones de animales de ganado vacuno, está contenido un inhibidor de tripsina-callicreína, que puede ser aislado desde ellos de diferentes maneras y que, en forma pura, es empleado, desde hace más de 15 años, como inhibidor polivalente de proteinasa y esterasa, con gran éxito en calidad de agente terapéutico en el caso de desarreglos enzimáticos.

Este inhibidor de tripsina-callicreína es un polipéptido básico con un peso molecular de 6.500 y un punto isoeléctrico (P.I) de aproximadamente 10,5. Consta de una única cadena de péptido con 58 aminoácidos, cuya estructura primaria es conocida de Biochemical and Biophysical Research Communications, Volumen 20, páginas 463 a 468 (1965), y que está reticulada mediante 3 puentes disulfuro.

El elevado valor terapéutico del inhibidor se debe a que se inhiben con él diferentes proteinasas y esterasas, tales como tripsina, quimotripsina, catepsina, plasmina y callicreína. Para ello, se inyectan, principalmente por vía intravenosa, a veces cantidades considerables del inhibidor. En este caso puede observarse que el inhibidor, después de un tiempo relativamente corto, es almacenado en los riñones de los animales de ensayo o del hombre. Hoy día se supone que esto

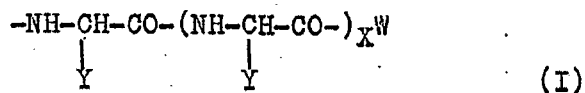
se debe a que la molécula de inhibidor fuertemente básica es fijada de manera no específica a mucopolisacáridos ácidos o a ácidos nucleicos. Sólo 1,5% del inhibidor natural es segregado con la orina; con el fin  
5 de hacer posible una segregación de la cantidad restante predominante, por parte del organismo se descomponen en primer término sendos aminoácidos situados respectivamente junto a amino y a carboxilo (arginina y alanina), se aglomera el inhibidor para proporcionar una  
10 forma de mayor peso molecular, y sólo a continuación se extrae por inundación o lavado, muy lentamente, desde los riñones.

Ensayos con inhibidor químicamente modificado, en el cual sobre todos los grupos amino libres se  
15 había introducido un grupo maleoilo, y que se manifestó como inactivo, han mostrado que esta sustancia, cuyo punto isoeléctrico había sido disminuído esencialmente, era extraída por inundación o lavado desde los riñones con muchísima mayor rapidez y podía ser segregada con la orina. Un inhibidor con plena eficacia  
20 biológica, que tuviese un P.I. menor, sería por lo tanto de considerable valor. En principio es posible ahora, por acilación de los grupos amino libres, disminuir las cargas positivas y reducir de este modo el  
25 punto isoeléctrico. En todas estas reacciones, no obs-

tante, se obtiene un producto de reacción por lo menos debilitado en su actividad, cuando no incluso inactivo, ya que los 5 grupos amino de la molécula han de asociarse con 4 grupos  $\epsilon$ -amino idénticos de la lisina y con 1 grupo  $\alpha$ -amino; pero por otro lado la lisina que se encuentra en la posición 15 es decisiva para el efecto inhibitorio de la sustancia. Una sustitución en el grupo amino de la lisina 15 de lugar a la pérdida de la actividad biológica.

Sorprendentemente se ha encontrado ahora que mediante prolongación de los 5 grupos carboxilo presentes con péptidos ácidos, la actividad del inhibidor es modificada sólo en pequeño grado o no es modificada, pero, por el contrario, por disminución del punto isoeléctrico el inhibidor modificado es segregado de los riñones con mucha mayor rapidez que la molécula no modificada.

Objeto del invento es, por consiguiente, un procedimiento para la preparación de derivados preparados de modo semisintético del inhibidor de tripsina-callicreína básico a partir de órganos de mamíferos, en donde los cinco grupos carboxilo presentes en la molécula de péptido están prolongados en forma de amidas mediante radicales péptidos de la fórmula general I,



en la que X representa los números 0 hasta 10, Y significa hidrógeno, ó un radical alcoholo de cadena recta o ramificada con 1 a 5 átomos de carbono, que eventualmente está sustituido con un grupo carbonilo, hidroxilo o carbonamido, pudiendo significar el radical

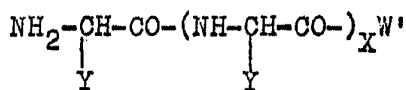
5 NH-CH-CO también el radical prolina, y en donde Y, caso

$$\begin{array}{c} | \\ \text{NH-CH-CO} \\ | \\ \text{Y} \end{array}$$

de que X sea 0, significa--CH<sub>2</sub>-COOH ó -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH, y caso de que X represente los números 1 hasta 10, por lo

10 menos una cadena lateral Y representa -CH<sub>2</sub>-COOH o CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH, en donde además W significa -OH, pero en el caso de presencia de por lo menos dos grupos carboxilo en las cadenas laterales, puede significar también

15 -NH<sub>2</sub>, -NH-CH<sub>3</sub>, -NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OCH<sub>3</sub> ó -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, el cual está caracterizado porque el inhibidor de tripsina-callicreína, cuyos cinco grupos amino primarios están protegidos mediante grupos protectores fácilmente separables en medio ácido, se hace reaccionar con aminoácidos o péptidos de la fórmula general II



25

5 en la que Y y X tienen los significados indicados, pero los grupos carboxilo existentes en Y están presentes en forma de éster ter.-butílico, W' significa ter.-butoxi, pero en el caso de presencia de por lo menos 2 grupos éster ter.-butílico en las cadenas laterales puede significar también  $-NH_2$ ,  $-NH-CH_3$ ,  $-NH-C_2H_5$ ,  $-OCH_3$  ó  $-OC_2H_5$ , en presencia de 1-hidroxi-benzotriazol y dicitclohexilcarbodiimida y a continuación se separan en medio ácido los grupos protectores.

10 Con el fin de poder modificar al inhibidor de tripsina-calicleína junto a sus grupos carboxilo, los grupos amino son bloqueados convenientemente mediante grupos protectores de amino fácilmente separables en medio ácido, tales como por ejemplo grupos ter.-alcoxicarbonilo. La introducción del grupo Boc frecuen-  
15 temente utilizado se logra de diferentes modos. Tanto con Boc-azida como también con Boc-ésteres activos, tales como por ejemplo el éster para-nitrofenílico o el éster N-hidroxisuccinimídico, pueden introducirse los  
20 grupos Boc. En todos los casos resulta un producto homogéneo según electroforesis en papel. Estos compuestos protegidos en N son hechos reaccionar, en presencia de 1-hidroxi-benzotriazol y dicitclohexilcarbodiimida, con un compuesto de la fórmula general II en dimetil-  
25 formamida o dimetilacetamida. Con ácido trifluoroáce-

tico o con HCl/ácido acético glacial son separados los grupos protectores y el producto bruto es o bien dializado o bien cromatografiado sobre Sephadex G25<sup>(R)</sup>, que es un gel de dextrana reticulado. Se aconseja cromatografiar el producto dializado, para la purificación adicional, también sobre Sephadex G 25<sup>(R)</sup>, o también someterlo a una cromatografía por reparto sobre Sephadex LH 20<sup>(R)</sup>, que es un gel de dextrana alcoholado reticulado.

10                    Con el fin de disminuir el punto isoelectrico del inhibidor de tripsina-calicleína, el radical aminoácido o péptido adyacentemente condensado debe poseer por lo menos dos grupos carboxilo. Entre los aminoácidos que se presentan en la naturaleza entran en consideración sólo ácido aspártico y ácido glutámico en sus formas L o D. En el caso de dipéptidos y de péptidos superiores, es posible, además de incorporar los aminoácidos ácidos, introducir también otros aminoácidos alifáticos, tales como, por ejemplo, glicina, alanina, lencina, valina, isoleucina, serina, treonina, asparagina, glutamina o prolina en sus formas L o D. No obstante, de modo preferible también en los péptidos superiores se utilizan ácido aspártico y ácido glutámico como eslabones de péptido. Si están presentes 25 dos o más grupos carboxilo en el péptido que se ha de

condensar adyacentemente en forma de los ésteres ter-  
butílicos, otros grupos carboxilo pueden estar presentes  
en forma de amidas o ésteres alcohólicos. Después del  
tratamiento en medio ácido con ácido trifluoroacético  
5 o con HCl/ácido acético glacial, se obtienen de este mo-  
do inhibidores de tripsina, que además de un bajo punto  
isoelectrico poseen adicionalmente grupos amido o grupos  
éster alcohólico.

Para comprobar la disminución del carácter bási-  
10 co y el aumento del carácter ácido en los derivados de  
inhibidor preparados de acuerdo con el invento, el inhi-  
bidor natural y preparados modificados fueron sometidos  
a electroforesis en microzonas sobre hoja de acetato de  
celulosa en el agente tampón de barbiturato de dietilo  
15 de pH 8,6.

El inhibidor natural se desplaza en el presente  
caso hacia el cátodo, mientras que los preparados modifi-  
cados, dependiendo del grupo modificado, se desplazan más  
o menos ampliamente hacia el ánodo. Para el inhibidor na-  
20 tural el tramo de desplazamiento catódico es de aproxima-  
damente 3 mm. Para los preparados modificados, en que el  
grupo modificador contiene, en los casos individuales,  
uno, dos, tres o cuatro aminoácidos ácidos, los tramos  
de desplazamiento anódico son de aproximadamente 1,5 mm,  
25 8 mm, 13,5 mm y 17 mm.

Por consiguiente, la modificación del inhibidor conduce a preparados cuyo carácter básico está disminuído y cuyo carácter ácido ha aumentado. La modificación con un grupo que contiene un único aminoácido ácido, ya conduce a tal disminución del punto isoeléctrico, de modo tal que a pH 8,6 el carácter ácido predomina un poco sobre el carácter básico.

Los puntos isoeléctricos susceptibles de ser calculados a partir de las constantes de disociación de los grupos funcionales del inhibidor y de sus derivados preparados de acuerdo con el invento, son de aproximadamente 10,5 para el inhibidor natural y respectivamente de alrededor de 8,6, 5,1, 4,8, y 4,6 para preparados modificados, en los que el grupo modificado contiene uno, dos, tres o cuatro aminoácidos ácidos.

Para la comprobación con microscopio y fluorescencia del almacenamiento en los riñones de inhibidor y de inhibidor modificado, se inyectaron en cada caso por vía intravenosa a 3 conejos, con un peso de 2,5 kg, cada vez en el mismo momento, 20 mg de inhibidor natural o 20 mg de inhibidor modificado de acuerdo con el invento. Después de dos días se retiraron los riñones, se cortaron y se incubaron con un preparado de  $\gamma$ -globulina marcado con fluoresceína, que se había obtenido a partir del antisuero de conejos, que con anterioridad habían sido ino-

culados varias veces con inhibidor y coadyuvante según Freund para aumentar la formación de anticuerpos.

En este caso, bajo el microscopio con fluorescencia se ofreció el siguiente cuadro.

5                    Todos los recortes de riñones de los animales tratados con el inhibidor natural, mostraron lugares fluorescentes grandes, en partes confluyentes, repartidos por todo el campo de visión, mientras que los recortes de los riñones de los animales que habían recibido  
10 el inhibidor modificado no mostraban la mayor parte de las veces ninguna fluorescencia y sólo en algunos pocos casos contenían pequeños lugares luminosos. Este ensayo mostró de manera inequívoca que el inhibidor cuyo punto isoelectrico ha sido disminuído es almacenado muchísimo  
15 menos, o incluso no es almacenado, en los riñones.

En ensayos previos se comprobó además, mediante doble difusión, que el preparado de anticuerpos utilizado no sólo reaccionaba frente al inhibidor natural, sino también frente a sus productos de reacción de acuerdo  
20 con el invento.

Para la determinación de la actividad de los inhibidores de tripsina-calicreína modificados se procedió del siguiente modo:

25 La solución de inhibidor fue previamente incubada con una cantidad establecida (correspondiente a una

determinada actividad) de solución de tripsina; después de corto tiempo se añade un substrato apropiado para tripsina, por ejemplo N-benzoil-arginin-4-nitroanilida (BAPA) y después de algún tiempo y tras haber detenido la reacción se mide cuantitativamente en un fotómetro con longitud de onda apropiada, por ejemplo 405 m $\mu$ , la coloración de amarillo debida a la separación de para-nitrofenol producida por tripsina no inhibida.

En particular se procede en este caso incubando una cantidad de tripsina (tripsina, cristalizada, purísima) que, determinada de modo previo, reunida durante 30 minutos a 37°C con BAPA, produce una determinada extinción a 405 m $\mu$ , junto con cantidades crecientes del inhibidor en un volumen constante. Después de incubación previa durante 30 minutos se añade la cantidad patrón. La reacción, después de 30 minutos de incubación con BAPA a 37°C, es detenida por adición de ácido acético diluido y se mide la coloración de amarillo que ha aparecido. Si se registran en un diagrama las cantidades añadidas de inhibidor en función de los correspondientes valores de extinción, se obtiene una curva, a partir de la cual se puede determinar con facilidad la cantidad de inhibidor que era capaz de inhibir hasta la mitad en cuanto a su efecto a la cantidad de tripsina añadida siempre en cantidad constante. Ya que era conocida la actividad o can-

tividad de tripsina que se había añadido, puede calcularse a partir de ello el número de mg de inhibidor que eran capaces de inhibir a una determinada cantidad de tripsina.

5                    En este ensayo, aproximadamente 1 mg del inhibidor modificado son capaces de inactivar aproximadamente 3 mg de tripsina.

10                   El inhibidor de tripsina-callicreína modificado de acuerdo con el invento sirve como medicamento en el caso de hemorragias como consecuencia de fibrinólisis excesiva; así, por ejemplo, sirve en la cirugía en el caso de hemorragias de próstata o perturbaciones de cicatrización de heridas, en la medicina interna como terapia adicional en el caso de hemófilos, en la ginecología en casos de placenta previa, muerte del feto intrauterina y hemorragia ulterior atónica, y para la profilaxia en el caso de operaciones en órganos parenquimatosos y en el caso de prostatectomías y embolias grasientas.

15                   Los nuevos medicamentos de acuerdo con el invento son inyectados por vía intravenosa en solución isotónica o son añadidos por goteo permanente después de haber diluido en soluciones de infusión, tales como por ejemplo solución fisiológica de sal común. Como dosificaciones entran en consideración las de 0,15 - 3 mg por kg.

25

Ejemplo 1

Inhibidor de tripsina-calicleína-penta-ácido-L-glutámico

5 A una suspensión de 900 mg de penta-Boc-inhi-  
bidor de tripsina-calicleína, 386 mg (1,3 milimoles) de  
HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>, 175 mg (1,3 milimoles), de HOBT y  
0,17 ml (1,3 milimoles) de N-etilmorfolina en 10 ml de  
dimetilformamida se añaden a 0°C, 284 mg de DCC y se agi-  
ta durante 1 hora a 0°C y durante 24 horas a la tempera-  
tura ambiente. El precipitado es filtrado con succión y  
10 el producto filtrado es concentrado. El residuo es tritu-  
rado con éter y secado. Rendimiento 1,39 g.

La sustancia obtenida de este modo es disuelta  
en 10 ml de ácido trifluoroacético. Se deja reposar duran-  
te 30 minutos a la temperatura ambiente y a continuación  
15 se concentra en vacío. El residuo es triturado con éter  
y filtrado con succión.  
Rendimiento 1,17 g.

La sustancia así obtenida es dializada frente a agua y  
secada por congelación. Rendimiento 710,3 mg.  
20 325 mg de la sustancia dializada y secada por congela-  
ción son cromatografiados sobre Sephadex LH 20<sup>(R)</sup> (colum-  
na de 100 x 2,5 cm) en el sistema de ácido acético gla-  
cial/butanol/agua (2:4:20). Se aislan 228 mg de una  
fracción pura.

25 Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu = 6:8,5  
(teórica 6:8)

Ejemplo 2

Inhibidor de tripsina-callicreína-penta-(Glu-Glu-OH)

5 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-callicreína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 625 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético y subsiguiente diálisis se obtienen 770,4 mg de sustancia bruta. 500 mg de esta sustancia bruta son purificados igual que en el Ejemplo 1.

10 Rendimiento 382 mg de una fracción pura.

Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu = 6:14,6 (teórica 6:13).

Ejemplo 3

15 Inhibidor de tripsina-callicreína-penta-(Glu-Glu-Glu-OH)

20 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-callicreína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 867 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,355 g de sustancia bruta, que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25 (R) (columna de 200 x 4 cm).

Rendimiento 674,9 mg de una fracción pura.

25 Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu=6:18,3 (teórica 6:18)

Ejemplo 4

Inhibidor de tripsina-calicleína-penta-(Glu-Glu-Glu-Glu-OH)

5 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-calicleína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 1,11 g (1,3 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,15 g de sustancia bruta, que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25<sup>(R)</sup> (columna de 200 x 4 cm). Rendimiento 10 745 mg de una fracción pura.

Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu= 6:23,4 (teórica 6:23)

Ejemplo 5

15 Inhibidor de tripsina-calicleína-penta-ácido aspártico

900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-calicleína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 365 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se 20 obtienen 1,083 g de sustancia bruta, que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25<sup>(R)</sup> (columna 200 x 4 cm).

Rendimiento 707,6 mg de una fracción pura.

Análisis de aminoácidos: proporción Gly: Glu: Asp = 25 = 6:3,2:10,5 (teórica 6:3:10)

Ejemplo 6

Inhibidor de tripsina-callicreína-penta-(Glu-Asp-OH)

5 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-callicreína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 610 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,1 g de sustancia bruta, que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25 (R) (columna de 200 x 4 cm). Rendimiento 759,3 mg de una fracción pura.

10 Análisis de aminoácidos: proporción de Gly:Glu:Asp = = 6,0:8,5: 10,5 (teórica 6:8:10)

Ejemplo 7

15 Inhibidor de tripsina-callicreína-penta-(Glu-Glu-Asp)

20 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-callicreína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 848 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,266 g de sustancia bruta que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25 (R) (columna de 200 x 4 cm). Rendimiento 727 mg de una fracción pura.

25 Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu: Asp = 5,5 : 13,6 : 10,0 (teórica 6: 13: 10).

Ejemplo 8

Inhibidor de tripsina-callicreína-penta-(Asp-Glu-Asp)

- 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-callicreína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 830 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,25 g de sustancia bruta, que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25<sup>(R)</sup> (columna de 200 x 4 cm).
- 5
- 10 Rendimiento 628,4 mg de una fracción pura.  
Análisis de aminoácidos : proporción Gly:Glu:Asp = 6,0 : 8,0 : 15,1 (teórica 6 : 8:15).

Ejemplo 9

15 Inhibidor de tripsina-callicreína-penta(Glu-Asp-Glu-Asp)

- 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-callicreína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 1,07 g (1,3 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,54 g de sustancia bruta que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25<sup>(R)</sup> (columna de 200 x 4 cm). Rendimiento : 634 mg de una fracción pura.
- 20
- 25 Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu:Asp =5,7 : 13,0 : 15,6 (teórica 6 : 13 : 15)

Ejemplo 10

Inhibidor de tripsina-callicreína-penta-(Glu-D-Glu-OMe)

5 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-callicreína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 597 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OMe (J. Chem. Soc. Perkin I 1972, página 1) análogamente al Ejemplo 1. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,2 g de sustancia bruta que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 10 25<sup>(R)</sup> (columna de 200 x 4 cm).  
Rendimiento 654 mg de una fracción pura.  
Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu = 6 : 13,7 (teórica 6:13).

15 Ejemplo 11

Inhibidor de tripsina-callicreína-penta-(Asp-Glu-NH<sub>2</sub>)

20 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-callicreína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 533 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-NH<sub>2</sub> (obtenido por hidrogenación catalítica de Z-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-NH<sub>2</sub>, que está descrita en J. Chem. Soc. C. (1968) página 531). Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,18 g de sustancia bruta, que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex 25 25<sup>(R)</sup> (columna de 200 x 4 cm).

Rendimiento 640 mg de una fracción pura.

Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu:Asp =

6,0:8,6:10,3 (teórica 6:8:10).

5 Ejemplo 12

Inhibidor de tripsina-calicleína-penta-(Asp-Ser-Asp-OH)

900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-calicleína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 720 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Ser-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. (J. Chem. Soc. C. Org. 1969, página 2218). Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,3 g de sustancia bruta, que son cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25<sup>(R)</sup> (columna de 200 x 4 cm).

15 Rendimiento 710 mg de una fracción pura.

Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Asp:Ser = 6:15,5:4,9 (teórica 6:15:6).

Ejemplo 13

Inhibidor de tripsina-calicleína-penta-(Glu-Glu-D-Glu-OH)

900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-calicleína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 867 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu-(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,25 g de sustancia bruta, que son cromato-

25

grafados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25<sup>(R)</sup>  
(columna de 200 x 4 cm).

Rendimiento 683,2 mg de una fracción pura.

5 Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu = 6,00:18,07  
(teórica 6:18).

#### Ejemplo 14

#### Inhibidor de tripsina-calicleína-penta-(D-Glu-D-Glu-D-Glu-OH)

10 900 mg de penta-Boc-inhibidor de tripsina-calicleína son hechos reaccionar análogamente al Ejemplo 1 con 867 mg (1,3 milimoles) de HCl.H-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>. Después de tratamiento con ácido trifluoroacético se obtienen 1,52 g de sustancia bruta, que son  
15 cromatografiados en ácido acético 0,1 M sobre Sephadex G 25<sup>(R)</sup> (columna de 200 x 4 cm).

Rendimiento 652,9 mg de una fracción pura.

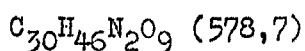
Análisis de aminoácidos: proporción Gly:Glu = 6:18,88 (teórica 6:18).

#### 20 Preparación de las sustancias de partida

##### a) Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

10,4 g (20 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OH.DCHA son agitados a 0°C entre 100 ml de éter y 20 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. La fase en éter es secada con sulfato de sodio y es  
25 concentrada. El residuo es disuelto en 50 ml de dimetil-

formamida. A esta solución se añaden 5,91 g (20 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>, 2,7 g (20 milimoles) de HOBT, 2,6 ml de N-etilmorfolina y a 0°C 4,4 g de DDC (en forma de solución en dimetilformamida). Se agita durante 5 1 hora a 0°C, durante 2 horas a la temperatura ambiente y se deja reposar durante la noche a la temperatura ambiente. Al día siguiente se filtra con succión el precipitado y se concentra el producto filtrado. El residuo es disuelto en acetato de etilo y la solución es lavada sucesivamente con solución de NaHCO<sub>3</sub>, con solución de KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 con solución de NaHCO<sub>3</sub> y con agua, es secada con sulfato de sodio y es concentrada. El residuo es cromatografiado en acetato de etilo sobre aproximadamente 30 g de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> básico (etapa de actividad I Woelm). El eluato es concentrado y secado en alto vacío . 15 Rendimiento 10 g de aceite (al 86%). Después de algún tiempo cristaliza el aceite, punto de fusión 88°C.



20 calc.:        C 62,26    H 8,01    N 4,84  
 enc.:        C 62,3      H 8,1     N 5,1

b) HCl. H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

25            9,6 g de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> son disueltos en metanol, mezclados con catalizador de Pd e hidro-

genados a pH 4,5 con ayuda de un autovalorador con adición de HCl metanólico 2N. Después de haberse terminado la hidrogenación, el catalizador es filtrado con succión y el producto filtrado es concentrado. Rendimiento 7,3 g de aceite (al 91%).

$C_{22}H_{40}N_2O_7 \cdot HCl$  (481,04)

c.) Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

A una solución de 6,2 g (12,9 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>, 1,74 g (12,9 milimoles) de HOBT, 1,68 ml (12 milimoles) de N-etilmorfolina en 60 ml de dimetilformamida se añaden 6,65 g (12,9 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OTcp, se agita durante 5 minutos y se concentra en alto vacío. El residuo es disuelto en acetato de etilo y es extraído por agitación como en a). Después de secar sobre sulfato de sodio se concentra y se tritura el residuo con éter de petróleo. Se enfría a 0°C y se filtra con succión.

Rendimiento 3,3 g (70%).

Punto de fusión: 111-113°C.

$[\alpha]_D^{22} = -29,8^\circ$  (c = 1, metanol)

$C_{39}H_{61}N_3O_{12}$  (763,94)

calc.: C 61,35 H 8,04 N 5,51

enc.: C 61,2 H 8,0 N 5,6

d) HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

5,8 g (7,6 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> son hidrogenados catalíticamente en metanol como en b). Rendimiento 4,8 g de aceite (al 95%).

5 C<sub>31</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> . HCl (666,3)

e) Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

10 A una solución de 3,9 g (5,85 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>, 0,79 g (5,85 milimoles) de HOBt y 0,76 ml (5,85 milimoles) de N-etilmorfolina en 50 ml de dimetilformamida se añaden 3,05 g (5,85 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OTep. Se agita durante 1 hora a la temperatura ambiente y se somete a tratamiento como en c). Rendimiento 4,75 g (86%) Punto de fusión 119 a 120°C.

15

$$[\alpha]_D^{22} = -29,1^{\circ} \quad (c = 1, \text{ metanol})$$

C<sub>48</sub>H<sub>76</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub> (949,2)

cal.: C 60,75 H 8,08 N 5,91

enc.: C 60,6 H 8,0 N 5,8

20

f) HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

4,4 g (4,63 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> son hidrogenados catalíticamente en etanol como en b).

25

Rendimiento 3,85 g de aceite (98%)

$C_{40}H_{70}N_4O_{13} \cdot HCl$  (851,5)

g) Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

5 52 g (0,1 moles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OH.DCHA son  
agitados entre éter y 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N a 0°C. La fase  
en éter es lavada una vez con agua, es secada con sulfa-  
to de sodio y concentrada. El residuo es disuelto en 200  
ml de dimetilformamida. A esta solución se añaden 28,1 g  
(0,1 moles) de HCl.H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>, 13,5 g de HOBT (0,1  
moles), 13 ml de N-etilmorfolina (0,1 moles) y a 0°C  
10 se añaden 22 g de DCC (en forma de solución en dimetil-  
formamida). Luego se procede como en a). El residuo cris-  
taliza al triturar con éter de petróleo. Rendimiento 42,9  
g (76%), punto de fusión 128 a 130°C. Para la purificación  
adicional la sustancia fué disuelta en éter y cromatogra-  
15 fiada sobre 120 g de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> básico.  
Rendimiento 34,7 g, punto de fusión 131 a 132 °C.

$[\alpha]_D^{22} = -17,9^\circ$  (c = 1, metanol)

$C_{29}H_{44}N_2O_9$  (564,7)

20 calc.: C 61,70 H 7,86 N 4,96

encont.: C 61,7 H 7,8 N 4,9

h) HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

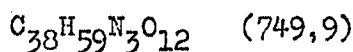
25 34,5 g (62 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-  
OBu<sup>t</sup> son hidrogenados catalíticamente en metanol como en  
b). Rendimiento 29,3 de aceite (al 100%).

$C_{21}H_{38}N_2O_7 \cdot HCl$  (467,01)

i) Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

5 A una solución de 1,25 g (26,7 milimoles) de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>, 3,6 g (26,7 milimoles) de HOBT, 3,5 ml (26,7 milimoles) de N-etilmorfolina en 100 ml de dimetilformamida se añaden a la temperatura ambiente 13,82 g (26,7 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OTcp. Se deja reposar durante 1 hora y se somete a tratamiento como en c). Rendimiento 24,7 g de aceite. Para la purificación adicional, el aceite, disuelto en éter, es cromatografiado sobre 75 g de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·básico. Rendimiento 17,65 g de masa amorfa (88%).

$$[\alpha]_D^{22} = -23,92 \quad (c = 1, \text{ metanol})$$



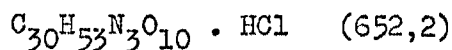
15 calc.: C 60,86 H 7,93 N 5,61

enc.: C 60,3 H 7,9 N 5,6

j) HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

17 g (22,7 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> son hidrogenados catalíticamente en metanol análogamente a b).

20 Rendimiento 14,34 g de masa amorfa (97%)



k) Z-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

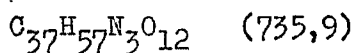
25 A una solución de 12,5 g (26,7 milimoles) de

HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> y 3,5 ml (26,7 milimoles) de N-etilmorfolina en 100 ml de dimetilformamida se añaden 11,25 g (26,7 milimoles) de Z-Asp(OBu<sup>t</sup>)-ONSu y se hace reaccionar a la temperatura ambiente durante aproximadamente 20 horas. Se somete a tratamiento de modo análogo a c). El residuo (18,4 g de aceite), para efectuar la purificación es disuelto en éter y es cromatografiado sobre 50 g de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> básico.

Rendimiento 13,4 g de sustancia amorfa (68%).

10

$$[\alpha]_D^{22} = -23,9^{\circ} \quad (c = 1, \text{ metanol})$$



calc.: C 60,4 H 7,81 N 5,71

enc.: C 60,0 H 7,1 N 5,6

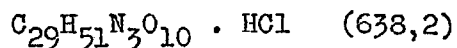
15

1) HCl.H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

12,8 g (17,4 milimoles) de Z-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> son hidrogenados catalíticamente en metanol análogamente a b).

Rendimiento 10,4 g de sustancia amorfa (94%).

20



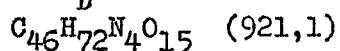
m) Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

A una solución de 6,4 g (10 milimoles) de HCl.H-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>, 1,35 g (10 milimoles) de HOBt y 1,3 ml (10 milimoles) de N-etilmorfo-

25

lina en 40 ml de dimetilformamida se añaden 5 g (10 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OTcp, se agita durante 1 hora a la temperatura ambiente y se somete a tratamiento análogamente a c). El residuo es triturado con éter de petróleo. Rendimiento 7,4 g (80%), punto de fusión 196°C.

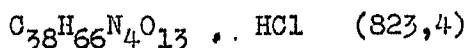
$$[\alpha]_D^{22} = -24,6^{\circ} \quad (c = 1, \text{ metanol})$$



Cal: C 59,98 H 7,88 N 6,08

10 enc: C 59,6 H 7,8 N 6,1

n. HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>  
7 g (7,6 milimoles) de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> son hidrogenados catalíticamente en metanol análogamente a b). Rendimiento 6,1 g de sustancia amorfa (97,5 %)



Penta-Boc-inhibidor de tripsina-calicleína

α) 1,3 g de inhibidor de tripsina-calicleína son disueltos en 10 ml de agua. A esto se añaden 50 ml de dimetilformamida y 4,4 ml de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. Luego se añaden 430 mg de Boc-ONSu, se agita a la temperatura ambiente durante 1 hora y se deja reposar durante la noche. Al día siguiente se acidifica a pH 5 con ácido acético. 2N. La solución transparente es concentrada en alto vacío. El residuo es triturado

con agua, filtrado con succión, bien lavado con agua y secado. Con acetato de etilo se tritura nuevamente, se filtra con succión y se seca. Rendimiento : 880 mg.

5 La electroforésis en papel proporcionó en medio ácido una sustancia homogénea, que era diferente del inhibidor de tripsina-callicreína.

10  $\beta$ ) 1,3 g de inhibidor de tripsina-callicreína son suspendidos en 20 ml de dimetilformamida. A esto se añaden 270 mg de HOBt, 480 mg de Boc-ONp y 0,14 ml de 1,1', 4,4'-tetrametilguanidina. En varias porciones se añaden 0,7 ml más de 1,1', 4,4'-tetrametilguanidina y 480 mg más de Boc-ONp. Se agita en total durante 2 días a la temperatura ambiente, se concentra y se agita el residuo con acetato de etilo. El precipitado es triturado con etanol y filtrado con succión. Rendimiento 15 950 mg. El producto obtenido es idéntico según electroforésis en papel a la sustancia obtenida de acuerdo con  $\alpha$ ).

20  $\gamma$ ) 7 g de inhibidor de tripsina-callicreína son disueltos en 77 ml de agua. A esto se añaden 315 ml de dimetilformamida, 24 ml de solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y 14 ml de Boc-azida. Se agita durante 5 horas a 35°C con ácido acético 2N se acidifica a pH 5 y se concentra en alto vacío. El residuo es triturado con agua 25 y filtrado con succión. Rendimiento: 6,5 g. El producto

obtenido es idéntico según electroforesis en papel a la sustancia obtenida de acuerdo con  $\alpha$ )

Preparación de las sustancias de partida.

p. HCl.H-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

5 Se prepara de manera análoga a a), b), c), y d). a partir de los correspondientes derivados de ácido D-glutámico. Los puntos de fusión corresponden a los compuestos L. Las rotaciones específicas de los compuestos D se corresponden en su magnitud también a las de los compuestos L, pero tienen un signo opuesto.

10

q. Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

15

A una solución de 2,96 g (10 milimoles) de HCl.H-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> y 1,35 g de HOBT en 20 ml de dimetilformamida se añaden 5,17 g de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OTcp y 2,6 ml de N-etilmorfolina. Después de 1 hora se concentra, se recoge el residuo en acetato de etilo y se lava con agua, con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, con solución de KHSO<sub>4</sub> y con solución de NaHCO<sub>3</sub>, se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentra. Para la purificación se cromatografía en cloruro de metileno sobre 70 g de gel de sílice. Después de que se hubo eluido con 400 ml de cloruro de metileno, la sustancia se eluyó con la mezcla de cloruro de metileno/acetona (9:1). Rendimiento 5,3 g de aceite.

20

r. HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

25

5,3 g de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> oleoso son hidro-

genados catalíticamente de modo análogo al Ejemplo b).

Rendimiento 3,64 g de aceite.

s. Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

5 A una solución de 3,6 g de HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> y 1,01 g de HOBT en 20 ml de dimetilformamida se añaden 0,97 ml de N-etilmorfolina y 3,88 g de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OTcp. Después de 1 hora se somete a tratamiento análogamente al Ejemplo c).

Rendimiento 4,35 g, punto de fusión 129-130°C.

10

$$[\alpha]_D^{22} = -10,4^{\circ} \text{ (c=1, en metanol).}$$

t.HCl.H-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup>

15 4,13 g de Z-Glu(OBu<sup>t</sup>)-Glu(OBu<sup>t</sup>)-D-Glu(OBu<sup>t</sup>)-OBu<sup>t</sup> son hidrogenados catalíticamente de modo análogo al Ejemplo b. Rendimiento 3,3 g de sustancia amorfa.

#### ABREVIATURAS

Boc	ter.-butiloxicarbonilo
20 Z	benciloxicarbonilo
OBu <sup>t</sup>	éster ter.-butílico
ONp	éster 4-nitrofenílico
ONSu	éster N-hidroxisuccinimídico
OTcp	éster 2,4,5-triclorofenílico
25 DCHA	diciclohexilamina

	DCC	diciclohexilcarbodiimida
	HOBt	l-hidroxibenzotriazol
	Gly	glicina
	Glu	glutamina
5	Asp	asparragina
	Ser	serina

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en República Federal Alemana, el 6 de Septiembre de 1973, con el nº P 23 44 886:4, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

#### REIVINDICACIONES

15

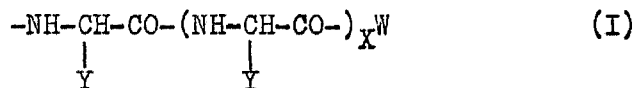
Los puntos de invención, propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

20

1ª.- Procedimiento para la preparación de derivados del inhibidor de tripsina-calicleína básico obtenido de órganos de mamíferos, en donde los cinco grupos carboxilo presentes de la molécula de péptido están prolongados en forma de amidas mediante radicales péptidos de la fórmula

25

la I



5

en la que X representa los números 0 hasta 10, Y significa hidrógeno o un radical alcoholo de cadena recta o ramificada con 1 a 5 átomos de carbono, que eventualmente está sustituido con un grupo carbonilo, hidroxilo o carbonamido, pudiendo significar el radical NH-CH-CO también el radical

10

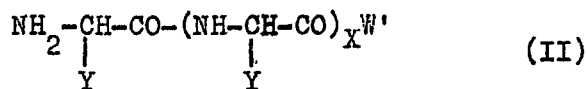


prolina, y en donde Y, caso de que X sea 0, significa -CH<sub>2</sub>-COOH ó -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH, y caso de que X represente los números 1 hasta 10, por lo menos una cadena lateral Y representa -CH<sub>2</sub>-COOH o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH, en donde además W significa -OH, pero en el caso de presencia de por lo menos dos grupos carboxilo en las cadenas laterales, puede significar también -NH<sub>2</sub>, -NH-CH<sub>3</sub>, -NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OCH<sub>3</sub> ó -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, caracterizado porque el inhibidor de tripsina-calicleína cuyos cinco grupos amino primarios están protegidos mediante grupos protectores fácilmente separables en medio ácido, se hace reaccionar con aminoácidos o péptidos de la fórmula general

15

20

II,



25

en la que Y y X tienen los significados indicados, pero los grupos carboxilo existentes en Y, están presentes en forma de éster ter.-butílico, a' significa ter.-butoxi, pero en el caso de presencia de por lo menos 2 grupos éster ter.-butílico en las cadenas laterales puede significar también -NH<sub>2</sub>, NH-CH<sub>3</sub>, -NH-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OCH<sub>3</sub> ó -OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, en presencia de 1-hidroxi-benzotriazol y dicitclohexilcarbodiimida, y a continuación se separan en medio ácido los grupos protectores:

2a.- Procedimiento para la preparación de derivados del inhibidor de tripsina-calicleína básico obtenido de órganos de mamíferos.

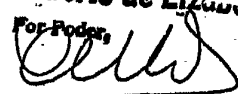
Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de treinta y tres hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

P.A.

-5 MAR. 1975

Alberto de Elgueta  
For-Poder  


28.2.75.  
Am.C.