

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

ES	(11) NUMERO	A1
	(21)	
	(22) FECHA DE PRESENTACION	

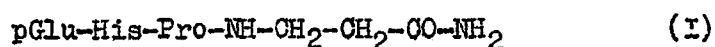
PATENTE DE INVENCION

(50) PRIORIDADES:		
(51) NUMERO	(52) FECHA	(53) PAIS
11725/74	28-8-74	Suiza
9302/75	16-7-75	Suiza
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(61) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
(4) TITULO DE LA INVENCION		
"PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE AMIDO PEPTIDOS"		
(71) SOLICITANTE (S)		
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
BASILEA (Suiza)		
(72) INVENTOR (ES)		
Dieter Gillessen - Rolf Studer - Arnold Trzeciak		
(73) TITULAR (ES)		
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.		
(74) REPRESENTANTE		
D. JAIME ISERN CUYAS Agente Oficial de la Propiedad Industrial.		

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a derivados amido péptidos y a un procedimiento para su preparación.

Los derivados amido péptidos proporcionados por el presente invento comprenden el compuesto L-piroglutamil-L-histidil-L-prolil-beta-alaninamida de la fórmula



en la que todos los aminoácidos que contienen un centro asimétrico tienen la configuración L,

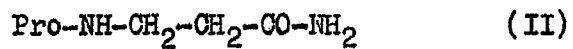
10. y sus sales de adición de ácido.

Las abreviaturas en esta descripción para los aminoácidos individuales y sus grupos protectores son las conocidas y utilizadas comunmente hasta ahora en la química de los péptidos [véanse Schröder E. y Lübke K.: The Peptides, Academic Press, Nueva York y Londres, volumen I (1965) y volumen II (1966) y Normas IUPAC-IUB]. Por consiguiente no se amplía aquí la definición de estas abreviaturas salvo "pGlu", con la que se denomina el ácido piroglutámico.

20. Ejemplos de sales de adición de ácido de los compuestos de la fórmula I son las sales con ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico, el ácido bromhídrico, el ácido fosfórico, el ácido sulfúrico, el ácido perclórico y similares, y con ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido oxálico, el ácido maleico, el ácido málico, el ácido tartárico o el ácido cítrico y similares. Se prefieren especialmente las sales de adición de ácido atóxicas, aceptables en farmacia.

Según el procedimiento proporcionado por el presente invento, los derivados amido péptidos antes citados (o sea el compuesto de la fórmula I y sus sales de adición de ácido) se preparan:

5. haciendo reaccionar el dipéptido de la fórmula:



con un dipéptido de la fórmula general:

10. $\text{pGlu-His-R}_1 \quad (\text{III})$

en la que

R_1 representa un grupo hidroxílico o un radical activador del grupo carboxílico, y si se desea,

15. convirtiendo el compuesto de la fórmula I obtenido en una sal de adición de ácido, presentando configuración L todos los aminoácidos de las fórmulas II y III anteriores que contienen un centro asimétrico.

20. Ejemplos de radicales activadores del grupo carboxílico son ésteres como el cianometílico, el p-cianofenílico, el p-nitrofenílico, el 2,4,5-triclorofenílico, el pentaclorofenílico, el tiofenílico, el p-nitrotiofenílico, el 1-benzotriazolílico, el ftalimidílico, el 1-succinimidílico, el 1-piperidílico, el 8-quinolílico, 25. el 5-cloro-8-quinolílico, el 2-piridílico, el 2-tiopiridílico, las azidas y los haluros.

La reacción del dipéptido de la fórmula II con un dipéptido de la fórmula III, puede efectuarse de manera ya conocida. De conveniencia esta reacción se efec-

- túa en un disolvente orgánico inerte, preferentemente un disolvente orgánico polar, como, por ejemplo, la dimetilformamida, el sulfóxido de dimetilo, el acetonitrilo o un hidrocarburo halogenado como el diclorometano, el cloroforno, etc. La reacción se desarrolla también convenientemente a una temperatura por debajo de la del ambiente. En el caso de que R_1 en un dipéptido de la fórmula III represente el grupo de hidroxilo, la reacción se lleva a cabo, convenientemente en presencia de un agente de condensación, como, por ejemplo, la dicitclohexilcarbodiimida, el carbonil-diimidazol o similares o también siguiendo el método de anhídrido mixto.

- Los materiales de partida de la fórmula II, son nuevos y se apreciará que éstos forman también parte del presente invento.

Estos materiales de partida pueden prepararse de manera ya conocida, utilizando los grupos protectores usuales, en particular los indicados antes.

- Los compuestos de la fórmula I antes expuestos y sus sales de adición de ácido aceptables farmacéuticamente tienen actividad antidepresiva y pueden usarse para el tratamiento de los síndromes depresivos.

- La actividad de antidepresivos puede explicarse por el hecho de que estas sustancias normalizan la actividad de neuronas noradrenérgicas en el cerebro, alterándose esta actividad en el caso de enfermedades depresivas. Las alteraciones en la actividad de neuronas noradrenérgicas puede demostrarse midiendo la liberación de noradrenalina (NA); por ejemplo, determinando la concentración de

5. NA endógena en el cerebro después del bloqueo de la síntesis de NA mediante el bis(4-metil-L-homopiperacínil-tio-carbonil)-disulfuro (FLA 63) inhibidor de la dopamina beta-hidroxilasa. Cuando una sustancia de prueba tiene actividad liberadora de la NA, esto se manifiesta por sí mismo en una intensificación de la disminución de NA inducido por FLA 63.

10. Para determinar la actividad antidepresiva del compuesto de la fórmula I anterior, se determinó 90 minutos después de la inyección i.p., de FLA 63 (5 mg/kg) la disminución de NA en todo el cerebro de ratones machos. El valor hallado después de la inyección de FLA 63 solo se ofrece en la Tabla que sigue como el 100%. La inyección simultánea de L-piroglutamil-L-histidil-L-prolil-beta-alaninamida (sustancia de prueba) conduce a una notable aceleración de la disminución de NA inducida por FLA 63.

T A B L A

	Noradrenalina (%)
20. FLA 63 solo (testigo)	100,0 \pm 1,2
FLA 63 más la sustancia de prueba	82,2 \pm 2,6

25. Por consiguiente, el compuesto de la fórmula I aumenta la liberación de NA en el cerebro de los ratones. Este descubrimiento, junto con el aumento observado en la actividad locomotora en los ratones, son una prueba de la actividad antidepresiva del compuesto de la fórmula I.

La L-pirolglutamil-L-histidil-L-prolil-beta-alaninamida de la fórmula I tiene una DL 10 superior a 8 g/kg p.o. y una DL₅₀ superior a 4 g/kg. i.v. en el ratón.

5. La dosificación debe regularse según las necesidades individuales y puede variar entre 100 microgramos y 1 mg i.v. o entre 10 y 100 mg p.o. por dosis individual, administrada una o varias veces al día.

10. Los compuestos de la fórmula I y sus sales de adición de ácido aceptables farmacéuticamente pueden utilizarse como medicamentos en forma de preparados farmacéuticos que contengan estos compuestos en asociación con un vehículo farmacéutico compatible. Este vehículo puede ser un material de vehículo inerte, orgánico o inorgánico, apto para administración enteral o parenteral, como, por
15. ejemplo, agua, gelatina, goma arábiga, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, polialquilenglicol, vaselina, etc. Los preparados farmacéuticos pueden tener forma sólida (por ejemplo, de pastillas, grageas, supositorios o cápsulas) o líquida (por ejemplo,
20. de soluciones, suspensiones, jarabes o emulsiones). Los preparados farmacéuticos pueden esterilizarse y/o contener coadyuvantes tales como agentes de conservación, estabilizadores, humectantes, emulgentes, sales para variar la presión osmótica o amortiguadores. Las formas de administración preferidas son las soluciones (ampollas), las
25. pastillas y las soluciones de rociadura intranasal.

Los ejemplos que siguen ilustran el procedimiento proporcionado por el invento.

EJEMPLO 1

a) clorhidrato de éster metílico de beta-alanina

Se calentaron en reflujo durante una hora 22 g de beta-alanina en HCl 4 N en metanol y a continuación se concentró en vacío hasta sequedad. Se repitió este tratamiento dos veces más y el aceite restantes se cristalizó en metanol-éter. Rendimiento: 27,5 g; punto de fusión 92°C.

b) éster metílico de tercibutiloxycarbonil-L-prolil-beta-alanina.

10. Se disolvieron en 160 cc de tetrahydrofurano 17,2 g de tercibutiloxycarbonil-L-prolina, se enfrió hasta -20°C y se trató con 11,1 cc de trietilamina y 7,7 cc de éster etílico de ácido clorofórmico. Se agitó la suspensión resultante a -20°C durante 5 minutos más y se
15. trató con una suspensión, previamente enfriada hasta -20°C, preparada a partir de 13,4 g de clorhidrato de éster metílico de beta-alanina y 13,4 cc de trietilamina en 160 cc de una mezcla de dimetilformamida y tetrahydrofurano (1:1). Se agitó la mezcla reaccional durante una hora por
20. debajo de -10°C y durante otra hora más a la temperatura del ambiente, se filtró y se concentró el filtrado en vacío. Se disolvió el residuo oleoso en 200 cc de acetato de etilo y se lavó por 3 veces, cada vez con solución al 5% de disulfato potásico, con agua, con solución al 5%
25. de bicarbonato sódico y con agua y se secó sobre sulfato sódico. Se concentró en vacío la fase orgánica y se cristalizó el residuo oleoso a partir de éter/éter de petróleo. Rendimiento: 19,2 g. Punto de fusión: 70°C, $[\alpha]_D^{25} = -39,2^\circ$ (c = 1 en dimetilformamida).

c) Tercibutiloxicarbonil-L-prolil-beta-alaninamida.

Se saturó a 0° C con amoníaco gaseoso una solución de 11 g de éster metílico de tercibutiloxicarbonil-L-prolil-beta-alanina en 80 cc de metanol y se la guardó durante dos días a la temperatura del ambiente. Luego se concentró la solución en vacío y se cristalizó el residuo a partir de metanol-agua. Rendimiento: 9,8 g. Punto de fusión: 175-177° C $[\alpha]_D^{25} = -44,5^{\circ}$ (c = 1 en dimetilformamida).

10. d) Acetato de L-piroglutamil-L-histidil-L-prolil-beta-alaninamida.

Por una solución de 9 g de tercibutiloxicarbonil-L-prolil-beta-alaninamida en 50 cc de ácido acético glacial se hizo pasar durante una hora cloruro de hidrógeno gaseoso, se concentró la solución en vacío y se seó en vacío durante la noche el clorhidrato de L-prolil-beta-alaninamida resultante.

Se trató a -20° C con 104 cc de HCl 1,64-N en tetrahidrofurano una suspensión de 7,64 g de L-piroglutamil-L-histidin-hidrazida en una mezcla de 95 cc de sulfóxido de dimetilo y 125 cc de dimetilformamida. Se añadieron a esta solución 5 cc de nitrito de isoamilo. Se agitó la mezcla a -20° C durante 30 minutos, se la enfrió hasta -30° C y se la neutralizó a esta temperatura con 23,7 cc de trietilamina. Se disolvieron 7,7 g de clorhidrato de L-prolil-beta-alaninamida en una mezcla de 20 cc de sulfóxido de dimetilo y 15 cc de dimetilformamida, se enfrió esta solución hasta -10° C, se la neutralizó con 4,9 cc de trietilamina y se añadió a la mezcla reaccional descrita

- anteriormente. La mezcla así obtenida se agitó a -20°C durante 1 hora, se guardó a 4°C durante 24 horas y se filtró. Se concentró el filtrado en vacío, se recogió el residuo en 350 cc de agua y se extrajo cinco veces con 70 cc de acetato de etilo cada vez. Se concentró en vacío la fase acuosa y se purificó el residuo por distribución de contracorriente en 1-butanol/ácido acético glacial/agua (4:1:5). Por concentración de las fracciones apropiadas en vacío y liofilización consecutiva se obtuvo el acetato
5. de L-piroglutamil-L-histidil-L-prolil-beta-alaninamida. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -83,42$ (c = 1 en ácido acético 1N).
10. Opcionalmente se disolvió el residuo de la extracción de acetato de etilo en 20 cc de ácido acético glacial, se mezcló con 30 cc de anhídrido de ácido acético
15. y se mantuvo la mezcla a la temperatura del ambiente durante una noche. Luego se diluyó la mezcla con 500 cc de agua y se concentró hasta sequedad en vacío. Se recogió el residuo hasta tres veces más en 50 cc de agua cada vez y se evaporó de nuevo hasta sequedad. Luego se disolvió el residuo obtenido en 50 cc de agua y se cromatografió sobre una columna de Amberlite OG-50 (forma H^{+}).
20. La L-piroglutamil-L-histidil-L-prolil-beta-alaninamida se eluyó con ácido acético 1 N. Las fracciones respectivas se combinaron y liofilizaron. Electroforesis de papel:
25. tampón de 2 cc de ácido acético glacial y 20 cc de piridina, completado con agua hasta 1 litro (pH 6): $R_f(\text{histidina}) = 0,73 \pm 0,05$. Tampón de 37 cc de ácido fórmico y 25 cc de ácido acético glacial, completado con agua hasta 1 litro (pH = 1,7): $R_f(\text{histidina}) = 0,43 \pm 0,05$.

EJEMPLO 2

Se preparan de la manera ordinaria pastillas con entalla de fragmentación y de la composición siguiente:

5.	Acetato de L-piroglutamil-L-histidil-prolil-beta-alaninamida	22,77 mg
	Almidón de maíz	80,00 mg
	Lactosa	67,23 mg
	Acido silícico precipitado	20,00 mg
10.	Polivinilpirrolidona	6,00 mg
	Talco	3,60 mg
	Estearato de magnesio	<u>0,40 mg</u>
		200,00 mg

EJEMPLO 3

15. Se preparan de la manera ordinaria soluciones para ampollas, de la composición siguiente:

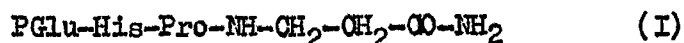
a)	Acetato de L-piroglutamil-L-histidil-L-prolil-beta-alaninamida	0,227 mg
	Manitol	0,1 mg
20.	Agua para inyección hasta	2,00 cc
b)	Acetato de L-piroglutamil-L-histidil-L-prolil-beta-alaninamida	0,569 mg
	Manitol	0,1 mg
	Agua para inyección hasta	2,0 cc

25. REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente suiza nº 11725/74 del 28 de agosto de 1974 y nº 9302/75 16 Julio 1975.

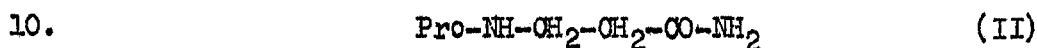
del

1.- Procedimiento para la preparación de amido péptidos de la fórmula

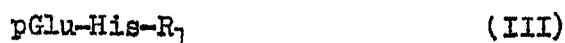


5. en la que todos los aminoácidos que contienen un centro asimétrico tienen la configuración L, y sus sales de adición de ácido, cuyo procedimiento comprende

hacer reaccionar el dipéptido de la fórmula



con un dipéptido de la fórmula general



en la que

15. R_1 representa un grupo hidroxílico o un radical activador del grupo carboxílico, y; si se desea, convertir el compuesto de la fórmula I obtenido en una sal de adición de ácido, presentando configuración L todos los aminoácidos de las fórmulas II y III que contienen un centro asimétrico.

20. 2.- Procedimiento para la preparación de amido péptidos.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 11 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

25. Madrid, a 27 Agosto 1975

P.a.

JAIME VIZCARRA
P. P.
Firmado por JOSÉ L. MORA