

443969

30 DIC. 1975

P.- 62.045

DE/PL
0629-75-B

Int. CIA. COYC; AGAK

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de CHOAY S.A.

entidad francesa

CONCEDIDA
11 ENE. 1977.

establecida en 48, Avenue Théophile-Gautier, 75016, Paris
Francia

por: "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN AGENTE PEPTIDICO
DE REGULACION DE LA GLUCEMIA".

20.12.75

- 1 -

**POOR
QUALITY**

Esta invención se refiere a un nuevo agente de regulación de la glucemia, de naturaleza peptídica. Se refiere también a procedimientos de obtención de este agente y a composiciones farmacéuticas que los contienen.

5 Los factores que influyen en la glucemia son numerosos, y los mecanismos que dirigen particularmente complejos, y no elucidados todavía para algunos.

Es sabido que la insulina juega un papel preponderante en la regulación de la glucemia. Se sabe también que numerosas diabetes se deben, bien a una producción insuficiente de insulina por el organismo, o bien a una inhibición de su actividad por efecto de agentes naturales cuya producción por el organismo tiende a des-
10 x controlarse, particularmente a hacerse excesiva. Entre
15 estos agentes figuran ciertos productos de degradación de la hormona del crecimiento que se encuentran en el plasma, tales como, particularmente, la cadena peptídica conocida con el nombre de somatina.

La invención tiene por objeto proporcionar un
20 nuevo medicamento cuya acción principal es oponerse a la acción de los inhibidores naturales de la insulina. Tiene también por objeto proporcionar un medicamento que tiende a regular la actividad hipoglucémica de la insulina.

Según la invención, estos objetos se consiguen
25 con el producto constituidos por la cadena peptídica de

la serie I siguiente: leucilo-serilo-arginilo-leucilo-fenilalanilo-aspartilo alfa-asparragilo-alanina (I).

5 La preparación de esta cadena se efectúa por síntesis, a partir de los aminoácidos constituyentes de la cadena peptídica de la invención, o a partir de elementos peptídicos resultantes de la condensación de dos o varios de estos aminoácidos de base, y por condensación de estos aminoácidos o elementos peptídicos, en una sucesión de etapas tal que los aminoácidos de base se encuentran en la cadena peptídica final en el orden indicado en la fórmula (I).

10 Según un modo preferido de preparación, la síntesis puede efectuarse en fase homogénea, es decir en disolución en un disolvente en el que los aminoácidos y los elementos peptídicos empleados son solubles.

15 Según otro modo ventajoso de preparación, se efectúa la síntesis en fase sólida, y más particularmente según la técnica descrita por Stewart y Young (Solid Phase Peptide Synthesis, San Francisco, W.H. Freeman, 1969).

20 La síntesis de las cadenas peptídicas bien definidas, no solo en la naturaleza y el orden de sus constituyentes, sino también en su estereoespecificidad, presenta numerosos problemas. Se sabe, en efecto, que las reacciones de condensación entre dos aminoácidos o dos

fragmentos peptídicos son ocasión de racemizaciones. Un método tradicional de síntesis de cadenas estereoespecíficas consiste en efectuar las condensaciones de modo recurrente comenzando por el extremo de la cadena que tiene el grupo carboxílico no implicado en un enlace peptídico, y después condensar progresivamente todos los aminoácidos constituyentes.

5
10
15
Esta técnica, que es aplicable a la síntesis del octapéptido de fórmula (I), presenta sin embargo algunos inconvenientes, y particularmente en cuanto a la purificación del producto final obtenido. Las reacciones de condensación no son nunca perfectas. Se comprueba siempre la formación de productos parásitos que deben eliminarse del producto final. La purificación es tanto más difícil, para una misma diferencia de peso molecular, cuanto más alto es el peso de los productos a separar. La purificación efectuada con el octapéptido completo obtenido de modo recurrente es, pues, en el caso presente, la que conlleva más dificultades.

20
25
Un modo usual de control de la estructura de las cadenas peptídicas sintetizadas consiste en efectuar una hidrólisis enzimática, particularmente con ayuda de una aminopeptidasa, como por ejemplo la leucina-aminopeptidasa. La hidrólisis así efectuada causa la ruptura sistemática del enlace peptídico más próximo al grupo amíni-

co terminal. El análisis de los productos de hidrólisis permite comprobar, por tanto, la estructura de las cadenas peptídicas. Ahora bien, se ha comprobado que la leucina-aminopeptidasa no permitía la hidrólisis de la cadena peptídica (I), de modo que era necesario poner a punto un método de análisis que permitiera comprobar la estereoespecificidad del octapéptido. Sin este método, era difícil, si no imposible, determinar las condiciones, y en particular las de las secuencias de acoplamiento de los aminoácidos sucesivos o de los fragmentos peptídicos, que permitieran llegar finalmente al octapéptido deseado.

Es la puesta a punto de este método de análisis lo que ha permitido determinar los modos preferidos de síntesis de la cadena peptídica (I), según los cuales se efectúa primero la síntesis de dos o tres fragmentos peptídicos, que después se condensan entre sí para constituir la cadena completa.

Se ha comprobado, en efecto, que es posible romper, por hidrólisis enzimática, las cadenas peptídicas al nivel de ciertos enlaces peptídicos bien determinados, y solamente cuando la cadena formada pertenece a la serie L. Cuando se efectúan las condensaciones de los fragmentos al nivel de estos enlaces hidrolizables, es posible asegurar que la condensación elegida no conduce

a una racemización de los productos, es decir que, por medio de esta reacción se obtiene el péptido de la serie L buscado. Para ello, una muestra de producto procedente de la condensación se somete a hidrólisis enzimática, y los productos resultantes se analizan, por ejemplo por cromatografía. Cuando la reacción es claramente estereoespecífica, es decir que el producto obtenido es de la serie L, se hidroliza y se encuentran únicamente los fragmentos iniciales. Si, por el contrario, la condensación conduce, aunque sea parcialmente, a la racemización, se encontrarán en los productos de hidrólisis las cadenas peptídicas no hidrolizadas correspondientes al isómero D.

Ventajosamente, se podrá hacer una condensación de fragmentos al nivel del enlace peptídico:

fenilalanilo - aspartilo.

Se ha podido demostrar, en efecto, gracias a la hidrólisis en presencia de quimotripsina, que la condensación de los fragmentos a este nivel se hacía prácticamente sin racemización.

Otro modo ventajoso consiste en efectuar la condensación de los fragmentos al nivel del enlace:

arginilo - leucilo.

Como anteriormente, se ha comprobado la ausencia de racemización a este nivel, por medio de una hidrólisis efectuada esta vez en presencia de tripsina.

Un modo particularmente ventajoso de síntesis de la cadena peptídica (I) consiste en preparar por separado los fragmentos leucilo-serilo-arginilo-leucilo-fenilalanina y aspartilo-asparagilo-alanina, y condensar después estos dos fragmentos. Efectuando la síntesis de este modo particular se evita prácticamente cualquier racemización en el momento de la condensación final.

Otros modos preferidos consisten en condensar los grupos de fragmentos siguientes:

leucilo-serilo-arginilo y
leucilo-fenilalanilo-aspartilo-asparagilo-alanina,
o incluso
leucilo-serilo-arginilo y
leucilo-fenilalanina, y después
aspartilo-asparagilo-alanina.

El empleo de fragmentos de pequeño tamaño hace además más fácil la purificación, especialmente después de la etapa final de condensación. La eliminación de los fragmentos iniciales del producto de condensación se facilita, en efecto, por la diferencia de peso molecular existente entre ellos.

Previamente se bloquean las funciones que deben protegerse durante los diferentes procesos de condensación de los aminoácidos o de los elementos peptídicos procedentes de condensaciones anteriores, por medio de grupos de

bloqueo que se eliminan una vez terminada la condensación. Estos grupos de protección son, por ejemplo: benciloxycarbonilo, terc-butiloxycarbonilo, etc., grupos que pueden eliminarse seguidamente.

5 La elección de los grupos de protección es función de varios factores, tales como su sencillez de puesta en práctica, su coste o su efectividad. Ha de entenderse que, además, han de poder eliminarse sin riesgo de degradación del producto preparado. Ventajosamente, se
10 emplean grupos hidrogenolizables para el bloqueo "a largo plazo", es decir para los bloqueos, mantenidos durante varias reacciones sucesivas, de las funciones químicas que llevan los aminoácidos empleados que no se utilizan en las reacciones de síntesis del octapéptido. Este es
15 particularmente el caso con la función ácida terminal. Son grupos hidrogenolizables, por ejemplo, los benciloxycarbonilo o el éster bencilico. Para los bloqueos a corto plazo, particularmente los de funciones amínicas, que no se realizan más que durante el tiempo de una condensación, se escogen ventajosamente grupos acidolizables tales como el grupo terc-butiloxycarbonilo. Los grupos saponificables se descartan de esta elección por la presencia del ácido aspártico en el octapéptido.

20
25 Los grupos para largo y corto plazo deben pertenecer a tipos diferentes, para que la eliminación de

unos no implique la eliminación simultánea de los otros. Sin embargo, pueden usarse, en particular para la última operación de condensación, grupos del mismo tipo, para efectuar el desbloqueo en una sola operación.

5 Según modos preferidos de síntesis del compues-
to según la invención, se procede, o bien por condensa-
ción directa de los grupos respectivamente amínicos y
carboxílicos de los aminoácidos o elementos peptídicos
que deben reunirse, en presencia de agentes que favore-
10 cen esta condensación directa, por ejemplo dicitclohexil-
carbodiimida, o bien recurriendo a una activación previa
de los grupos carboxílicos que han de intervenir en la
condensación. Por ejemplo, los grupos carboxílicos pue-
den esterificarse con un alcohol susceptible de propor-
15 cionar una función "éster activado" de este aminoácido.

 Es este último modo el que se profiere en el
curso de la síntesis para la condensación de la aspara-
gina. El empleo de la dicitclohexilcarbodiimida podría
conducir a una deshidratación indeseable. Se emplea,
20 por ejemplo, el éster paranitrofenílico de la asparagina.

 Además, durante la condensación de fragmentos
entre sí, es ventajoso introducir un producto como el hi-
droxibenzotriazol, que permite evitar la racemización, al
menos en su mayor parte.

25 Durante la síntesis y después de cada condensa-

ción, es ventajoso aislar y purificar el producto de condensación formado. Se pueden efectuar estas operaciones, por ejemplo, por cromatografía y por recristalizaciones en disolventes apropiados.

5 Efectuando la síntesis según el modo descrito anteriormente, se obtiene un producto constituido, prácticamente en su totalidad, por el octapéptido buscado; sin embargo, si se quiere aumentar más su pureza, se puede recurrir a un método de purificación particular. Se
10 ha comprobado, por cromatografía, la presencia de una mancha débil correspondiente a las impurezas, y que se distingue difícilmente de la correspondiente al octapéptido. Para eliminar esta impureza, se efectúa ventajosamente, una cromatografía sobre una columna cambiadora
15 de iones rellena con carboximetilcelulosa. La cantidad de carboximetilcelulosa que contiene debe ser suficiente para fijar la totalidad de la muestra de producto introducida (en disolución acuosa). Se necesitan unos 60 mg. de carboximetilcelulosa por 50 mg. de producto.

20 El producto se introduce en la columna en disolución en agua. Se efectúa después una elución con una disolución de ácido acético suficientemente diluida para tener una elución diferencial de la impureza y el octapéptido, teniendo las impurezas, en estas condiciones,
25 a pasar antes que el octapéptido. Una vez eliminada

la impureza, lo que puede comprobarse en las muestras por medio de una rápida cromatografía de éstas en capa fina, se acelera la velocidad de elución del octapéptido empleando una disolución de ácido más concentrada. De modo ventajoso, la concentración de las dos disoluciones ácidas es, respectivamente, del orden de 0,05 M y 1 M.

La sustancia (I) se emplea en composiciones farmacéuticas, eventualmente en asociación con excipientes y coadyuvantes fisiológicamente aceptables y eventualmente también con otros agentes activos.

El medicamento así constituido es útil en el tratamiento de ciertas formas de diabetes, con el fin particular de regular las interacciones de la insulina segregada con otros agentes, por ejemplo fracciones de la hormona del crecimiento, que tienen una acción antagonista con respecto a la insulina.

En una forma particularmente preferida de la invención, ésta se refiere también a un medicamento en que se asocian, en la misma forma, insulina y el producto según la invención.

Aún se pondrán de manifiesto otras características de la invención en la descripción que sigue, con referencia a un modo preferido de preparación del compuesto de fórmula (I), y a los ensayos farmacológicos que han permitido poner de manifiesto las notables propiedades

de este compuesto.

El procedimiento indicado a continuación como ejemplo pone en juego condensaciones sucesivas de aminoácidos o elementos peptídicos, bien por vía directa, bien por activación previa de las funciones que intervienen en estas condensaciones. Sea cual fuere el modo de puesta en práctica elegido, el producto de condensación obtenido (después de filtrarlo en el caso de las condensaciones efectuadas en presencia de la dicitclohexilcarbodiimida, con el fin de eliminar la fracción sólida), se purifica de la manera siguiente:

El disolvente se elimina bajo vacío a 35°C. El residuo oleoso o cristalino se toma de nuevo en acetato de etilo y se lava sucesivamente con una disolución de ácido cítrico al 10% en agua destilada, una disolución de CO_3HNa M, y después con agua destilada hasta pH neutro. La disolución orgánica se seca sobre MgSO_4 durante 20 minutos y después se filtra, o bien se filtra directamente sobre papel hidrófobo (Schleicher y Schull). Después de la concentración, el producto puede cristalizarse.

Los grupos de protección, como por ejemplo el terc-butiloxicarbonilo, se eliminan en todos los casos por hidrólisis ácida. Igualmente, la hidrólisis se efectúa siempre por medio de una disolución de ácido clorhídrico normal en ácido acético (20 minutos a temperatura

ordinaria), la disolución se concentra hasta sequedad, se toma de nuevo varias veces en acetona y se vuelve a concentrar cada vez. El producto obtenido se seca bajo vacío en un desecador en presencia de KOH, y después
5 generalmente se cristaliza en metanol-éter.

En la descripción que sigue, las abreviaturas empleadas tienen los significados siguientes:

	Z = benciloxicarbonilo	Leu = leucina
	BOC = terc-butiloxicarbonilo	Ser = serina
10	OBzl = éster bencílico	Arg = arginina
	OMe = éster metílico	Ala = alanina
	DMF . N,N'-dimetilformamida	Phe = fenilalanina
	Asn = asparagina	Asp = ácido aspártico

La preparación del compuesto según la invención
15 se ha realizado en el ejemplo considerado, siguiendo las secuencias de preparación descritas a continuación.

1^o - Preparación de BOC-Asn-Ala-OBzl (I)

1,5 g (4,24 milimoles) del éster paranitrofenílico de BOC-asparagina se añaden a una disolución enfriada a 0°C de 1,7 g (4,84 milimoles) de p-toluensulfonato del éster bencílico de alanina y 0,53 ml (4,84 milimoles) de N-metilmorfolina, en 15 ml. de dimetilformamida. Al ca
20 bo de 24 horas a temperatura ambiente, el producto se purifica como se ha descrito antes. En suspensión en éter,
25 se obtienen después de filtración 1,33 g (79%) de produc

to, que tiene un punto de fusión y un poder rotatorio (en dimetilformamida) de, respectivamente 138-141°C y

$$\alpha_D^{25} = 17,5^\circ \text{ (c=1,02, DMF).}$$

2ª - Preparación de HCl. Asn-Ala-OBzl (II)

5 1,33 g (3,38 milimoles) de (I) se tratan con 10 ml. de una disolución de HCl N en ácido acético y después como se ha descrito antes, y se obtienen 863 mg (79%) de producto, cuyo punto de fusión es de 125-136°C.

10 3ª - Preparación de BOC-Asp(OBzl)-Asn-ala-OBzl (III)

585 mg (1,8 milimoles) del éster beta-bencílico de ácido BOC-aspártico se añaden a una disolución, en friada a 0°C, de 636 mg (1,9 milimoles) de (II) y 0,2 ml (1,9 milimoles) de N-metilmorfolina en 10 ml. de dimetilformamida. Tras 24 horas a temperatura ambiente, el producto se purifica como se ha descrito antes. Por cristalización en acetato de etilo y éter de petróleo se obtienen 680 mg (63%) de producto, que tiene un punto de fusión y un poder rotatorio en dimetilformamida de, respectivamente, 128-130°C y $\alpha_D^{25} = -14,55^\circ \text{ (c=1,02, DMF).}$

20 4ª - Preparación de HCl . Asp(OBzl)-Asn-Ala-OBzl (IV)

572 mg. (0,96 milimoles) de (III) se tratan con 5 ml. de una disolución de HCl N en ácido acético y después como se ha descrito antes se obtienen 443 mg (87%) de producto, que se descompone a 195°C y tiene un poder

rotatorio en metanol de $\alpha_D^{25} = -15,7^\circ$ (c=1, metanol).

5^a - Preparación de BOC-Leu-Phe-OMe (V)

4,26 g (20 milimoles) de BOC-Leucina, y después 433 g (21 milimoles) de dicitclohexilcarbodiimida, se añaden a una disolución enfriada a 0°C de 4,75 g (22 milimoles) del éster metílico de fenilalanina, y 2,4 ml (22 milimoles) de N-metilmorfolina en 30 ml. de tetrahidrofurano. Tras 20 horas a temperatura ambiente, el producto se purifica como se ha descrito antes, y después se cristaliza en acetato de etilo y éter de petróleo. Se obtienen así 4,954 g (64%) de producto, cuyas constantes de punto de fusión y poder rotatorio son: P. de f. 87,88°C;

$\alpha_D^{25} = -19,5^\circ$ (c=1, DMF).

6^a - Preparación de HCl . Leu-Phe-OMe (VI)

4,417 g (11,3 milimoles) de (V) se tratan con 25 ml. de una disolución de HCl N en ácido acético y después como se ha descrito antes se obtienen 2,980 g (81%) de producto, cuyas constantes son: P. de f. 196-199°C;

$\alpha_D^{25} = + 11^\circ$ (c=2, metanol).

7^a - Preparación de BOC-Arg(NO₂)-Leu-Phe-OMe (VII)

2,72 g. (8,5 milimoles) de BOC(NO₂)-arginina, y después 1,78 g (8,6 milimoles) de dicitclohexilcarbodiimida, se añaden a una disolución, enfriada a 0°C, de 2,98 g (9,1 milimoles) de (VI) y 1 ml (9 milimoles) de N-metilmorfolina en 15 ml. de dimetilformamida. Tras 20 horas a

temperatura ambiente, el producto se purifica como se ha descrito antes, y después se cristaliza en acetato de etilo y éter de petróleo. Se obtienen 4,24 g de producto (85%).

P. de f. 95°C; $\alpha_D^{25} = -10,9^\circ$ (c=1, metanol).

5 8º - Preparación de HCl . Arg(NO₂)-Leu-Phe-OMe (VIII)

4,24 g (7,1 milimoles) de (VII) se tratan con 20 ml. de una disolución de HCl N en ácido acético y después como se ha descrito antes se obtienen 3,40 g. de producto, p. de f. 150°C. Por recristalización en mezcla metanol-éter, se obtienen 2,40 g. de producto (64%), de p. de f. 198-200°C.

10 9º - Preparación de BOC-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-Leu-Phe-OMe (IX)

15 1,32 g (4,4 milimoles) de BOC-Ser(OBzl), y después 660 mg (4,4 milimoles) de hidroxibenzotriazol y 908 mg (4,4 milimoles) de dicitohexilcarbodiimida, se añaden a una disolución, enfriada a 0°C, de 2,40 g (4,5 milimoles) de (VIII) y 0,5 ml. (4,5 milimoles) de N-metilmorfolina en 15 ml. de metilformamida. Tras 20 horas a temperatura ambiente el producto se purifica como se ha descrito antes. Se obtienen 3,3 g. de un aceite (92%).

20 10º - Preparación de HCl . Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-Leu-Phe-OMe (X)

25 3,3 g (4,3 milimoles) de (IX) se tratan con 15

ml. de una disolución de HCl N en ácido acético y después como se ha descrito antes. Se obtienen 2,6 g de producto de p. de f. 195-200°C. Tras una recristalización en una mezcla de metanol-acetato de etilo-éter de petróleo, se obtienen 2,40 g de producto (81%).

P. de f. 200°C; $\alpha_D^{25} = 152$ (c=1, metanol)

11ª - Preparación de BOC-Leu-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-Leu-Phe-OMe (XI)

832 mg. (3,6 milimoles) de BOC-Leu(4), después 550 mg (3,6 milimoles) de hidroxibenzotriazol y 743 mg (3,6 milimoles) de dicitclohexilcarbodiimida, se añaden a una disolución, enfriada a 0°C, de 2,6 g (3,65 milimoles) de (X) y 0,40 ml. (3,7 milimoles) de N-metilmorfolina en 10 ml de dimetilformamida. Tras 20 horas a temperatura ambiente, se filtra la dicitclohexilurea, y el líquido de filtración se concentra hasta sequedad. El residuo se recoge en acetato de etilo acuoso, medio en el que el producto precipita. Sin embargo, se purifica como se ha descrito antes. Se obtienen 2,18 g. de producto (68%). P. de

f. 184-188°C; $\alpha_D^{25} = -30$, 1ª (c=1, metanol).

12ª - Preparación de BOC-Leu-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-Leu-Phe-OH (XII)

450 mg (0,5 milimoles) de (XI) se disuelven en caliente en 4 ml de metanol. Se añaden en frío 1 ml de una disolución N de KOH. Al cabo de 3 horas a temperatura

ambiente se añaden 20 ml. de agua y después se acidifica en frío con ácido cítrico. El precipitado obtenido se filtra y se seca, se obtienen 400 mg (90%). P. de f. 107-115°C; $\alpha_D^{25} = 19,2^\circ$ (c=1, metanol).

5

13^a - Preparación de BOC-Leu-Ser(OBzl)-Arg(NO₂)-Leu-Phe-Asp(OBzl)-Asn-Ala-OBzl (XIII).

10

400 mg (0,45 milimoles) de (XII) y después 77 mg (0,5 milimoles) de hidroxibenzotriazol y 103 mg (0,5 milimoles) de dicitclohexilcarbodiimida, se añaden a una disolución, enfriada a 0°C, de 300 mg (0,55 milimoles) de (IV) y 0,06 ml (0,55 milimoles) de N-metilmorfolina, en 5 ml. de dimetilformamida. Tras 24 horas a temperatura ambiente, la dicitclohexilurea precipitada se filtra y el líquido de filtración se concentra casi hasta sequedad. Por adición de agua se obtiene un precipitado que se filtra y se seca, y después se recristaliza en DMF, éter y éter de petróleo. Se obtienen 500 mg de producto (81%). El análisis de aminoácidos de un producto de hidrólisis ácida total de este producto (efectuado en tubo cerrado herméticamente bajo vacío a 110°C durante 24 horas, en presencia de HCl 6N) conduce al resultado siguiente:

15

20

Leu 1,9; Ser 0,9; Arg 1; Phe 0,9; Asp 2,1; Ala 1,2.

P. de f. 183-185°C; $\alpha_D^{25} = 21$ (c=1, DMF)

25

14^a - Preparación de HCl . Leu-Ser-Arg-Leu-Phe-

Asp-Asn-Ala (XIV)

- 5 430 mg (0,315 milimoles) de (XIII) se toman en 10 ml. de ácido acético. En presencia de paladio al 5% sobre carbón, una corriente de hidrógeno atraviesa la disolución durante 10 horas. La suspensión se filtra después sobre celite y el líquido de filtración, concentrado, se trata con 2 ml. de una disolución de HCl N en ácido acético, y después como se ha descrito antes; por precipitación en acetona se obtienen 300 mg. de producto (92%).
- 10 50 mg. del producto obtenido se recogen en 5 ml de una disolución de ácido acético al 2%, y después se colocan sobre una columna (1 x 20 cm) de una resina cambiadora de aniones, débilmente básica, del tipo conocido comercialmente con el nombre de Amberlite IR 45 (forma de acetato), previamente equilibrada con el mismo disolvente
- 15 que se emplea para la elución. Los tubos en los que se recoge el producto se concentran (o se liofilizan). El residuo se toma en 1 ml. de agua destilada, y después se coloca en una columna (0,5 x 30 cm) de carboximetilcelulosa.
- 20 Se eluye con 32 ml. de agua por fracción de 2 ml., y después con 20 ml. de una disolución de ácido acético 0,05 M. Finalmente se eluye con una disolución de ácido acético 1 M, recuperando las muestras procedentes de esta última elución; se obtienen, tras liofilización, 40 mg. de producto.
- 25 La pureza del producto se comprueba por comatogra-

ffia sobre placas de gel de sílice con el disolvente A.

El poder rotatorio del producto obtenido es $\alpha_D^{25} = -14^{\circ}$
(en ácido acético glacial).

5 El análisis de aminoácidos tras hidrólisis ácida total es: Leu 2,06; Ser 0,95; Phe 0,98; Arg 0,97; Asp 2,11; Ala 1,04. Da un rendimiento en péptido de 95,6% (calculado, 47,77 mmoles; encontrado 45,67 mmoles).

10 Por otro lado, en el curso de la síntesis y tras la condensación de los fragmentos leu-ser-arg-leu-phe y asp-asn-ala, se efectúa el control de la estereoespecificidad de la reacción sobre una muestra del producto. Este control se realiza del modo siguiente.

15 Aproximadamente 1 micromol del péptido se incubaba a 37°C en 0,5 ml. de tampón de acetato de amonio (pH 8,1) y se añaden 50 microgramos en alfa-quimotripsina. Al cabo de 20 horas se añaden 0,5 ml. de ácido acético y la mezcla de reacción se liofiliza. El residuo se recoge en 0,3 ml. de agua destilada y se cromatografía sobre placa de gel de sílice en la mezcla de disolvente n-butanol-piridina-ácido acético-agua (30-20-6-24, en vol/vol).
20

Los puntos de fusión se han determinado en tubos capilares con el aparato del Dr. Tottoli (Ets. BUCHI FLAWIL-SUISSE) y no se han corregido. Las medidas de constantes físicas y los análisis elementales se efectuaron con productos secados bajo vacío (10^{-2} mm Hg), generalmente
25

durante 20 horas a 78°C. Los análisis elementales se efectuaron con un aparato de microanálisis C.H.N. automático Perkin-Elmer. Los poderes rotatorios se determinaron con ayuda de un polarímetro electrónico Perkin-Elmer modelo 241. Las cromatografías se han hecho sobre placas finas de gel de sílice (Merck) en la mezcla de disolventes (A) : n-butanol-piridina-ácido acético-agua (30-20-6-24, en vol/vol.), ó (B) : n-butanol-ácido acético-agua (4-1-5 fase superior).

Se describirán ahora algunos ensayos farmacológicos que demuestran las excelentes propiedades del péptido de fórmula (I), y particularmente su papel como "favorecedor" de la actividad reguladora de la insulina con respecto a la glucemia.

a) Acción enzimática in vitro

El efecto inhibitorio de productos de degradación de la hormona del crecimiento, particularmente la somantina, se manifiesta frente a diferentes enzimas.

En este ensayo, el compuesto (I) se ha sometido a ensayo por su facultad para aumentar la inhibición de una somantina extraída a partir de un plasma, frente a la acción de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa.

Con este fin, se ha medido la actividad de la enzima en presencia sucesivamente, de la somantina sola, del compuesto (I) solo y finalmente en presencia de so-

mantina y el compuesto (I).

En este ensayo se ha empleado la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa a una concentración de 0,5 microgramo/ml, la somantina a 25 microg./ml y el compuesto (I) a 50 microg./ml.

El método empleado para las medidas es el de Phil y Lang (J. Biol. Chem. 237 : 1356-1362, 1962).

El tanto por ciento de inhibición de la enzima encontrado en estas condiciones es el siguiente:

10	con somantina	65,3% (b)
	con el compuesto (I)	1,0%
	con somantina + compuesto (I)	48,2% (c)

15
$$\text{Grado de inversión} = \frac{b - c}{b} \times 100 = 26,2 \%$$

Estos resultados muestran claramente el efecto inhibitor de la somantina. Por el contrario, el compuesto (I) no tiene prácticamente efecto sobre la actividad de la enzima. Sin embargo, el compuesto (I) permite, cuando se administra conjuntamente con la somantina, suprimir parcialmente el efecto inhibitor de la somantina.

20

b) Consumo de glucosa in vitro

25 Para seguir este consumo, se trabaja con el hemidiafragma de rata, aislando in vitro. El método

empleado es el descrito por Park y col. (Effect of insulin on free glucose content of rat diaphragm in vitro.- Amer. J. Physiol. 182 : 12-16, 1955).

5 El hemidiafragma procedía de ratas macho albinas Wistar con un peso de 200 a 250 g. por individuo. Las ratas se alimentaron ad libitum durante 7 días y ayunaron a continuación 24 horas.

10 Las disoluciones estudiadas contenían 2 mg/ml de glucosa, 500 microU./ml. de insulina. El compuesto (I) se introdujo a 250 microg./ml.

El consumo de glucosa, referido al peso de tejido en gramos por hora, era, en estas condiciones:

15

Disolución	Consumo de glucosa, en mg.
Glucosa	2,26 ± 0,14
glucosa + insulina	4,10 ± 0,15
glucosa+insulina+compuesto(I)	5,34 ± 0,17

20 De lo que antecede se deduce que el consumo de glucosa en presencia de insulina crece en presencia del compuesto (I).

c) Efecto del compuesto (I) sobre la acción de la insulina in vivo

25 Las determinaciones se han efectuado en el curso

de ensayos practicados para determinar, en el conejo, la resistencia a la glucosa inyectada por vía intravenosa.

5 Estos ensayos se efectuaron con conejos adultos sometidos a un ayuno previo de 24 horas. Se extrajo sangre y se determinó el contenido de glucosa de las tomas de sangre. La medida se efectuó por el método del ferricianuro, como el adoptado para el "Autoanalyseur Technicon" (J. Biol. Chem. 120 : 51-55, 1937). Se ha determinado así
10 el contenido en ayunas, y después su variación tras inyección intravenosa de glucosa, en razón de un gramo por kilo. Estas medidas se repitieron después con conejos que habían recibido, 5 minutos después de la glucosa, una inyección intravenosa del compuesto (I) (5 mg/kg).

15 Estos ensayos han mostrado que el descenso de el contenido de glucosa es más grande para los conejos que habían recibido el compuesto (I). Siempre para éstos, el contenido de glucosa alcanza incluso valores inferiores a los que se miden en los conejos en ayunas.

20 Unos ensayos similares, efectuados en intervalos de varios días, han permitido también mostrar que persiste un efecto sobre el metabolismo glucídico varios días después de la inyección del compuesto (I).

25 d) La influencia del octapéptido (I) en la glucemia se ha determinado en ratones en condiciones similares a las

descritas para los conejos. El experimento comprendía dos series de ensayos, para estudiar los efectos inmediatos y los efectos prolongados.

5 En la primera serie de ensayos se efectúa una inyección simultánea de glucosa y del octapéptido (I), y se ha seguido en función del tiempo el descenso, de la glucemia, con relación a la de animales testigos que no habían recibido mas que la glucosa.

10 Las inyecciones fueron, respectivamente, de 0,25 g. de glucosa y 2 mg. por kilo de peso del animal, o sea de unos 40 microg. de octapéptido (I), es decir 20 mg. por ratón.

15 Tras las inyecciones se comprueba una reducción de la glucemia, netamente más acentuada en los animales que habían recibido el octapéptido (I).

20 En la segunda serie de ensayos, los ratones reciben el producto antes de la inyección de glucosa. Se efectúan tres inyecciones de 40 mg. cada una de octapéptido (I), respectivamente 72, 48 y 24 horas antes de la inyección de glucosa.

25 Como anteriormente, se comprueba un descenso más rápido de la glucemia en los ratones tratados con el octapéptido (I) que en los ratones testigos que no reciben la glucosa. Por lo tanto, el efecto de este producto no es solo inmediato.

e) Efecto del octapéptido (I) en la glucemia de animales diabéticos.

5 En este ensayo se ha comparado la reducción de la glucemia tras inyección simultánea de glucosa, por un lado, y por otro, o bien octapéptido (I), o insulina, o bien los dos a la vez.

10 Los ensayos se han efectuado con ratas diabéticas, mantenidas en ayuno durante 4 horas antes de la inyección de glucosa (en proporción de 0,5 g/kg. de peso de animal).

15 Los resultados muestran que, en los animales que reciben el octapéptido (I), la glucemia no se modifica prácticamente. La glucemia de las ratas que han recibido la insulina desciende rápidamente, se estabiliza, y después vuelve a subir al cabo de unos 120 minutos. Para las ratas que reciben a la vez la insulina y el octapéptido (I), la glucemia disminuye mucho antes que con la insulina sólo, y, además, los contenidos mínimos alcanzados se mantienen mucho más tiempo, hasta incluso más de 20 360 minutos después de la inyección.

f) Modo de acción del octapéptido (I)

25 Para tratar de aclarar el mecanismo de acción del octapéptido (I) en relación con la insulina, se han estudiado primero los fenómenos al nivel de los receptores de insulina de células lipídicas tripsinadas, para

destruir en ellas los receptores citados. Las células tripsinadas no fijan la insulina, pero, si se introduce el octapéptido (I) en el medio, la fijación vuelve a aparecer.

5 Igualmente, se ha medido el grado de unión de la insulina a células hepáticas colocadas en un medio de reacción apropiado. Cuando el medio contiene el octapéptido (I), crece el grado de enlace o unión de la insulina a las células hepáticas. El resultado es similar si
10 se incuban dichas células con el octapéptido (I).

 Finalmente, se ha determinado la acción del octapéptido (I) sobre los receptores de glucosa que son los islotes de Langerhans. A este efecto, el octapéptido (I) se ha inyectado a animales sobre los que se extraen,
15 un día o cuatro días más tarde, los islotes de Langerhans. Estos se colocan en un medio de reacción al que se ha añadido glucosa, y se determina la cantidad de insulina desprendida. Con relación a los testigos que no han recibido el octapéptido (I), se comprueba un aumento muy sensible de la proporción de insulina desprendida.
20

De todos estos ensayos parece que se pueden concluir los principios siguientes sobre el modo de acción del octapéptido (I):

25 - no es activo cuando actúa sólo, pero favorece la acción de la insulina, incluso cuando esta última está

en cantidad muy pequeña:

- se comprueba que favorece la síntesis de los receptores de la insulina, lo que parece que corresponde a la acción inmediata (acción aguda);

5 - se comprueba también que sensibiliza las células beta a la glucosa; a esta sensibilización correspondería la acción crónica o permanente.

g) Tolerancia

10 Se ha hecho un estudio de toxicidad aguda y subaguda con ratones durante 1 mes, recibiendo cada ratón dosis (diarias) correspondientes a 5 a 10 veces la dosis activa. Los estudios macro y microscópicos no han revelado efecto tóxico en estas condiciones.

15 Los ensayos farmacológicos que acaban de describirse ponen, pues, de manifiesto el hecho de que el compuesto (I) según la invención es capaz de ejercer una acción de regulación con respecto a agentes tales como la somantina, en la medida en que estos podrían inhibir las acciones reguladoras de la insulina con relación a la
20 glucemia. Ponen también de manifiesto el hecho de que el compuesto según la invención es además capaz de estimular la acción reguladora de la insulina.

25 Sus propiedades farmacológicas hacen del compuesto según la invención un principio activo de medicamento, empleable no solamente sólo, sino también en asociación

con insulina, para el tratamiento de ciertas diabetes. Así, el compuesto (I) puede emplearse para el tratamiento de las diabetes en las que la secreción de insulina es normal. En asociación con la insulina, se pueden tratar también las diabetes causadas por la "no utilización" de la insulina, o incluso aquellas para las que es necesario obtener una glucemia normal estable en el tiempo.

Este compuesto permite también realizar ahorros de insulina en los tratamientos para los que se muestre necesaria.

Finalmente, permite prolongar los intervalos de tiempo que separan la administración reiterada de dosis de insulina.

Puede administrarse por vía inyectable (intravenosa o intramuscular), particularmente en forma de disolución en el seno de un disolvente inyectable estéril, o por vía oral, especialmente en asociación con excipientes sólidos farmacéuticamente aceptables.

De modo ventajoso, el compuesto (I) se dosifica de modo que presente una actividad suficiente, y más particularmente del orden de 0,2 a 10 mg/día, y especialmente del orden de 1 mg/día.

La presente solicitud, que corresponde a la presentada en Francia, el 31 de Diciembre de 1974, bajo el Nº 74/43.513, se acoge a los beneficios del Artículo 51

del vigente estatuto sobre Propiedad Industrial.

5

REIVINDICACIONES

10

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:

15

1ª.- Un procedimiento de preparación de un compuesto constituido por la cadena peptídica leucina-serina-arginina-leucina-fenilalanina-ácido aspártico-asparagina-alanina (I), caracterizado por efectuar la síntesis a partir de los aminoácidos constituyentes de la cadena peptídica (I), o a partir de elementos peptídicos resultantes de la condensación de dos o varios de estos aminoácidos de base, y por condensación de estos aminoácidos o elementos peptídicos, en una sucesión de etapas tal que los aminoácidos de base se encuentren en la cadena peptídica final en el orden indicado en (I).

20

25

2ª.- Un procedimiento de síntesis según la reivindicación 1ª, por condensación de fragmentos peptídicos, caracterizados porque dichos fragmentos se eligen entre aquellos cuya condensación se rompe por hidrólisis enzimática.

5

3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª, caracterizado porque la hidrólisis enzimática se efectúa con ayuda de quimotripsina o de tripsina.

4ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª ó la reivindicación 3ª, caracterizado porque se condensan los fragmentos peptídicos

10

leu-ser-arg-leu-phe y asp-asn-ala.

5ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª ó la reivindicación 3ª, caracterizado porque se condensan los fragmentos peptídicos

15

leu-ser-arg y Leu-phe-asp-asn-ala.

6ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª ó la reivindicación 3ª, caracterizado porque se condensan sucesivamente los fragmentos peptídicos

20

Leu-ser-arg y leu-phe,

y el producto obtenido con asp-asn-ala.

7ª.- Un procedimiento de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado, porque se efectúa la síntesis en fase homogénea, es decir en disolución en un disolvente en el que los aminoácidos

25

y los elementos peptídicos empleados son solubles.

5 8ª.- Un procedimiento de preparación según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado por que se efectúa la síntesis en fase sólida según el método de Stewart y Young.

10 9ª.- Un procedimiento de preparación según la reivindicación 7ª, caracterizado porque se efectúa, al menos, una de las condensaciones de los aminoácidos y/o elementos peptídicos de modo directo por medio de dicitclohexilcarbodiimida.

15 10ª.- Un procedimiento de preparación según la reivindicación 7ª, caracterizado porque se efectúa, al menos, una de las condensaciones de los aminoácidos y/o los elementos peptídicos, por unos de los métodos llamados "de activación" de los grupos carboxílicos, de manera conocida per se.

20 11ª.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 10ª, caracterizado porque, para purificar el producto obtenido, se pone en disolución acuosa, se hace pasar por una columna de cromatografía rellena con carboximetilcelulosa, eluyéndose las impurezas por medio de una disolución de ácido acético de alrededor de 0,05 M, y eluyéndose después el octapéptido con una disolución de ácido acético 1 M.

25 12ª.- PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN AGEN-

DE PARTIDICO DE RECUPERACION DE LA CIUDADIA.

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.

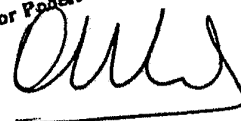
5

Madrid, 21 ENE. 1976

P.A.

Alberto de Eizaburu

Por Poder.



20.12.75

R.R.R.

- 33 -