



ESPAÑA

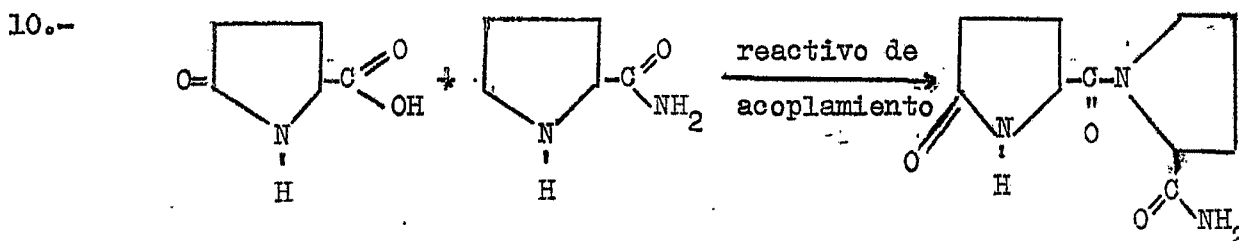
19	ES	11	NUMERO	10	A1
		21	<b>449624</b>		
		22	FECHA DE PRESENTACION		
			7 Julio de 1976		

**PATENTE DE INVENCION**

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
28678/75	8 de Julio de 1975	INGLATERRA
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	52 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	CO4D	
54 TITULO DE LA INVENCION		
PROCEDIMIENTO PARA LA PRERARACION DE LA L-PIROGLUTAMIL-L-PROLINA MIDA.		
71 SOLICITANTE (S)		
U C B, S. A.		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
SAINT-GILLES-LEZ-BRUXELLES (Bélgica) 4, Chaussée de Cgarleroi		
72 INVENTOR (ES)		
Albert Loffet, el cual cede todos sus derechos a la sociedad solicitante.		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
FRANCISCO JAVIER PLAZA Y SAENZ DE CENZANO		

La presente invención se refiere a un nuevo compuesto, la L-piroglutamil-L-prolinamida, a su preparación y a su utilización en terapéutica en el tratamiento de la senescencia, con vistas a la mejora de las deficiencias seniles.

5.- Según la presente invención, se prepara la L-piroglutamil-L-prolinamida, a la manera conocida de suyo, haciendo reaccionar el ácido L-piroglutámico con la L-prolinamida en presencia de un reactivo de acoplamiento, en un medio orgánico, según la ecuación:



15.- Las dos materias primas utilizadas para preparar la L-piroglutamil-L-prolinamida son conocidas y se encuentran en el comercio. Así, por ejemplo, el ácido L-piroglutámico, se distribuye por parte de la firma americana ALDRICH CHEMICAL Co., Inc., en tanto que la L-prolinamida lo es por parte de la casa americana CYCLO CHEMICAL; esta última sustancia puede igualmente prepararse por amonólisis del ester etílico correspondiente, según el método de R.W, CHAMBERS y F.M.CARPENTER, J. Am.chem.Soc. 77, (1955), 1522-26.

25.- Como reactivos de acoplamiento para esta reacción, pueden utilizarse los agentes de acoplamiento clásicos, y en especial, la dicitclohexilcarbodiimida, y la 1-etoxi-carbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleina, Por lo que se refiere a las sustancias utilizables a tal efecto, pueden citarse las enumeradas en el artículo de la revista firmado por Y.S. KLAUSNER y M. BODANSKI, Synthesis, 1972, pag. 453-463.

30.-

Como medio de reacción para el procedimiento de preparación de acuerdo con la invención, pueden utilizarse disolventes orgánicos, como el tetrahidrofurano, la dimetilformamida, el dioxano, el acetato de etilo, el diclorometano, etc.

5.- A título de ilustración, puede prepararse la L-piroglutamil-L-prolinamida, de la siguiente manera:

EJEMPLO.

10.- Se introduce en un balón de 10 litros provisto de tres cuellos, agitador y ampolla de vertido, 283,3 g (1,2 moles) de ácido L-pirolutámico y 193,1 g (1,7 moles) de L-prolinamida.

15.- Se le añade 4 litros de dimetilformamida, se enfría la solución así obtenida a 0°C, y se añade, sin dejar de agitar, durante el espacio de una hora, 488 g (2,37 moles) de dicitclohexilcarbodiimida disueltos en 2 litros de diclorometano. Se mantiene la temperatura entre 0 y 5°C durante la adición. Se continúa agitando durante 48 horas, al tiempo que se deja llegar poco a poco la mezcla a la temperatura ambiente. Se añade entonces 3 litros de agua para precipitar la dicitclohexilurea (formada a expensas de la dicitclohexilcarbodiimida). Se filtra el precipitado, y se lava con agua. Se evapora el filtrado hasta la desecación, y se traslada el residuo a 1 litro de agua. Se forma un precipitado, que se elimina mediante filtración. Después de evaporación en agua, el aceite obtenido como residuo se disuelve en 1 litro de acetonitrilo caliente, y la solución límpida así obtenida, se pone a cristalizar en nevera. Se filtran los cristales obtenidos de este modo, se les lava con 100 ml de acetonitrilo, y se les seca.

20.- Se obtiene de éste modo una primera carga de 262,6 g de L-pirolutamil-L-prolinamida con un rendimiento del 63,5 % en relación con la prolinamida inicial. Puede, además, recuperarse

25.-

30.-

se producto de la invención en el agua madre, lo que permite elevar el rendimiento hasta cerca del 70% del teórico.

La L-pirolglutamil-L-prolinamida cristaliza en la forma de monohidrato.

5.- Punto de fusión: 98°C

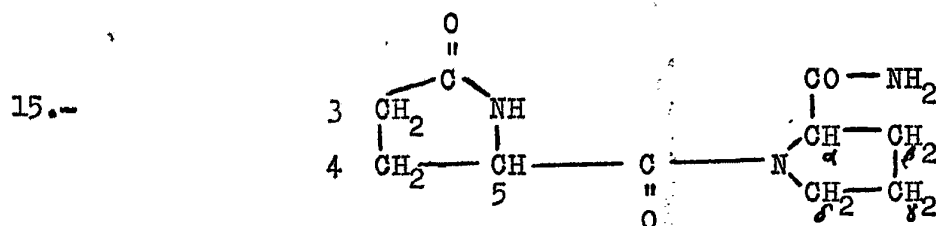
22

$\alpha_D = -100^\circ$

Análisis elemental:

calculado (%) : C 49,4      H 7,0      N 17,28      H<sub>2</sub>O 7,40  
 10.- encontrado (%):    50,0      7,1      17,10      6,74

Espectro de resonancia magnética nuclear determinado con un aparato PERKINS-ELMER a 60 MHz y con D<sub>2</sub>O/TMS



ppm	multiplicidad	integración	atribución
2,1	M	4H	2H <sup>4</sup>
20.-			2H <sup>3</sup>
2,5	M	4H	2H <sup>6</sup> 2H <sup>7</sup>
3,7	M	2H	2H <sup>8</sup>
4,5	M	2H	H <sup>5</sup>
25.-			H <sup>2</sup>

Los protones de los grupos amido del ácido L-pirolglutámico y de la L-prolinamida se intercambian con D<sub>2</sub>O y aparecen entonces a  $\delta = 4,65$  ppm.

30.- Las resonancias se han atribuido mediante comparación con los espectros de resonancia de los residuos pirolglutamil, y

prolinamida en la molécula de TRH (hormona de desprendimiento de tirosina). Véase S. FERMANDJIAN y cols. FEBS Letters, 28, (1972), 156 y J.C. BOILOT y cols., C.R.Acad.Sci.Paris, Serie C 276, (1973), 217.

5.- El análisis del hidrolizado ácido de la molécula, in dica la estequiometría correcta para los distintos constituyentes: Glu/Pro/NH<sub>3</sub>: 1/1/1.

Propiedades farmacológicas.

10.- Se sabe que a consecuencia del envejecimiento del or ganismo, se asiste en el anciano, que aparentemente no padece ninguna enfermedad, bien definida, a la implantación progresi va de una serie de procesos de involución, más ó menos rápida, que se manifiestan a través de perturbaciones de la homeosta- sis general.

15.- Estas alteraciones son frecuentes, y aparecen prin- cipalmente a la altura de tres ejes endocrinos: el eje insulí nico, el eje tiroideo y el eje gonádico.

20.- Es bien sabido, por ejemplo, que la respuesta insu- línica a una hiperglucemia alimenticia o provocada, es dife- rente, y ampliamente disminuída en el anciano en relación con la que se produce en el adulto sano (prediabetes). Lo mismo- sucede con la capacidad de fijación del yodo por parte de la glándula tiroides (Handbook of Endocrinology, Ed. R.D. DILLON, LEA Y FEBIGER - Filadelfia 1973).

25.- No existe actualmente ninguna terapéutica que permi ta oponerse eficazmente a estos tipos de alteraciones.

30.- Según la presente invención se ha descubierto que el nuevo compuesto de la invención, la L-piroglutamil-L-prolinami da, es eficaz para corregir los trastornos metabólicos o endo- crinos propios de la senescencia. Este compuesto restaura en

especial la capacidad de adaptación del organismo y su respuesta a determinados estímulos, como por ejemplo, la hiperglucemia provocada, pese a que ésta pueda no ser en sí misma un agente estimulante de la liberación de insulina.

5.- Pruebas farmacológicas.

1. Prueba de hiperglucemia provocada o de tolerancia a la glucosa.

(DILLON Y cols. obra cit.)

10.- La prueba de tolerancia a la glucosa consiste en administrar a ratas, por vía oral, una dosis de 1 g/Kg de glucosa en solución en 1 ml de agua, y en medir a continuación en el plasma la cantidad de insulina liberada (IRI), a intervalos de 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. La respuesta normal a esta prueba, es una figura triangular en la que el máximo de insulina liberada se sitúa hacia los 15 minutos.

15.- Se trataron diez ratas de 12 meses de edad, durante una semana, con suero fisiológico. El último día, sufrieron una sobrecarga de glucosa conforme a la prueba descrita. La respuesta insulínica es pequeña.

20.- Estos mismos animales fueron tratados a continuación por vía oral, durante cinco días, con L-piroglutamil-L-prolinamida con dosis de 40 mg/Kg, en solución en 1 ml. de agua. La prueba de tolerancia a la glucosa, se realizó seguidamente como en el caso anterior.

25.- Los resultados se resumen en el cuadro que sigue:

Medidas en t=	Insulinemias (µU/ml)			
	antes del tratamiento	Valores extremos <sup>+</sup>	Después del tratamiento	Valores extremos <sup>+</sup>
0 <sup>h</sup>	11	10,5-12	10,1	9,1-10,9
15 <sup>h</sup>	17	15,5-19	34	33,8-35

30.-

30'	10,3	9,5-11	23	20,5-24
60'	9	8,2-10,1	5	3,4-6,5
120'	4,2	2,8-5,7	7,1	6 -8,6
5.- Superficie de la figura triangular	1100	978-1248	1541,2	1369,5-1697,25

† Valores extremos

Estos valores representan los valores extremos medidos sobre una misma muestra (variaciones debidas a la técnica de medida empleada). No representan la variabilidad de los animales propiamente dichos, procediendo al suero analizado de los sueros recogidos de los 10 animales.

A título indicativo, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en un grupo de animales jóvenes, no tratados. Los resultados se recogen en el siguiente cuadro:

15.- Tiempo	$\mu\text{U/ml}$	Valores extremos
t 0	8,5	7,5 - 9,5
t 15	21	20 -22,5
t 30	31	29 -33
t 160	15	-15

20.- Conviene señalar que la tasa de base de insulina antes de la sobrecarga de glucosa (tiempo 0) no resulta modificada por el tratamiento. Esto demuestra por tanto, que el producto no es de suyo liberador de insulina.

25.- Esta misma prueba se llevó a cabo, igualmente, con perros. Con la dosis de 5 mg/Kg, el efecto más intenso de la L-pi-roglutamil-L-prolinamida se observa en los animales que presentan las glucemias y las insulinemias de base más elevada. Los animales que presentan una tasa de insulina baja, pero una glucemia normal, no responden prácticamente a este tratamiento.

30.- Con dosis inferiores (1 mg/Kg), el tratamiento no ejerce prác

ticamente ya influencia sobre las tasas de glucosa y de insulina, salvo en el caso de una perra tratada, que estaba grávida, y que presentó tasas de insulina elevadas y una glucemia normal. Como resultado del tratamiento, la glucemia y la insulinemia se restablecieron a valores exactamente comparables a los de los otros animales.

5.-

## 2. Prueba de incorporación de glucosa $^{14}\text{C}$ .

En el curso del envejecimiento, se asiste a una de saceleración general del metabolismo celular, tanto de los sistemas de producción de energía (glucolisis, oxidaciones mitocondricas) como de los sistemas de biosíntesis macromoleculares (síntesis del RNA, de las proteínas, etc.). El objeto de ésta prueba, es seguir la incorporación de la glucosa  $^{14}\text{C}$  en las fracciones macromoleculares de animales de edad avanzada. Se aplicó a 10 ratones hembra (raza NMRI) de 20 meses de edad, con un peso promedio de  $38 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$ .

10.-

15.-

Después del tratamiento de 10 días con la L-piroglutamil-L-prolinamida (0,1 mM/Kg) y de la administración de una dosis de glucosa  $^{14}\text{C}$ , se sacrificaron cinco horas más tarde los animales para determinar la cantidad de glucosa

20.-

$^{14}\text{C}$  incorporada en diferentes órganos (hígado, corazón, cerebro). Los resultados obtenidos demuestran que la incorporación del precursor radioactivo se vé estimulada en diferente grado en los extractos orgánicos y protéicos, así como en las fracciones enriquecidas con RNA y DNA. El órgano en el que estos efectos parecen más marcados, es el cerebro en las condiciones experimentales utilizadas (medida 5 horas después de la administración de glucosa  $^{14}\text{C}$ ).

25.-

## 3. comportamiento de los animales.

30.-

En el curso de las experiencias realizadas con ra-

tones, se observó que los animales mayores tratados con la L-pirolglutamil-L-prolinamida, presentan una mayor vivacidad que los controles. Este aumento de la vivacidad, pudo traducirse en cifras, enjaulando un número sensiblemente igual de ratones tratados y de ratones controlados, anotando el orden en que fueron capturados los animales, y realizando el análisis estadístico mediante la prueba de la mediana (véase W.J. CONOVER, Practical non parametric Statistics, Ed. Wiley + Sons, 1971 página 167). Se ha notado, que esta diferencia de vivacidad entre los animales tratados y los animales de control, no se advierte más que en el momento en el que se les captura, siendo por el contrario idéntico su comportamiento en reposo.

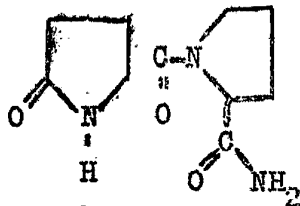
Las preparaciones farmacéuticas que contienen el producto conforme a la invención, se administran por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea y oral a dosis que varían entre 1 y 200 mg/Kg al día.

A título de ejemplo no limitativo de preparados farmacéuticos de acuerdo con la invención, se citará: para un comprimido nº 1: 25 mg de L-pirolglutamil-L-prolinamida  
400 mg de lactosa  
10 mg de estearato de magnesio.

N O T A

En resumen, la presente solicitud recaerá sobre las siguientes reivindicaciones.

1ª.- Procedimiento de preparación de la L-pirolglutamil-L-prolinamida, caracterizado por comprender la fórmula:



30.-

MGE

2ª.- Procedimiento para la preparación de la L-pi  
roglutamil-L-prolinamida, según la reivindicación primera,  
caracterizado por hacerse reaccionar el ácido L-pirolglutámico  
con la L-prolinamida en presencia de un reactivo de acopla-  
5.- miento en un medio orgánico.


3ª.- Procedimiento para la preparación de la L-pi  
roglutamil-L-prolinamida, según la reivindicación segunda,  
racterizado porque el reactivo de acoplamiento se escoge en  
10.- tre la dicitohexilcarbodiimida y la l-etoxi-carbonil-2-eto  
xi-1,2-dihidroquinoleína.

4ª.- Procedimiento para la preparación de la L-pi  
roglutamil-L-prolinamida, según una de las reivindicaciones  
segunda y tercera, caracterizado porque el medio orgánico se  
escoge entre el tetrahidrofurano, la dimetilformamida, el  
15.- dioxano, el acetato de etilo y el diclorometano.

5ª.- PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LA L-PI  
ROGLUTAMIL-L-PROLINAMIDA.

Según se describe en la presente memoria descripti  
va que consta de nueve hojas escritas a máquina por una sola  
20.- de sus caras.

Madrid, - 7 JUL. 1976  
Francisco Javier Plaza  
P. P.



ME