



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

ES (11) (21) (22)

NUMERO	457.069
FECHA DE PRESENTACION	22.3.77

(10) A 1

- 5 OCT. 1978

P.- 65.363

PATENTE DE INVENCION

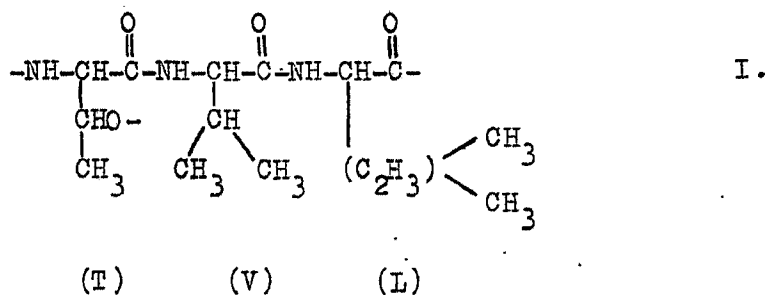
A1 457.069

781101

CO7C 103/52

30 PRIORIDADES:		
31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
669.526	23.3.76	EE.UU.
NO REGISTRA ESTA PRIORIDAD - NO REGISTRA ESTA PRIORIDAD - NO REGISTRA ESTA PRIORIDAD		
47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	CO7C//A61K	
54 TITULO DE LA INVENCION		
"UN METODO MEJORADO PARA PREPARAR UN POLIPEPTIDO"		
71 SOLICITANTE (S)		
STATE OF MICHIGAN		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Lansing, Michigan, Estados Unidos de América		
72 INVENTOR (ES)		
Charles Edward Frohman		
73 TITULAR (ES)		
74 REPRESENTANTE		
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ		

1 Este invento se refiere a composiciones de ma-
 2 teria que son útiles en el tratamiento de la esquizofre-
 3 nia. Más particularmente, el invento se refiere al tra-
 4 tamiento de la esquizofrenia por el empleo de polipépti-
 5 dos, ésteres de polipéptidos acilados en omega-N y/o que
 6 contienen hidrocarburos. Los polipéptidos tienen de 3 a
 7 aproximadamente 8 restos de alfa-aminoácidos y una estruc-
 8 tura característica,



especialmente polipéptidos tales que contienen T-V-L aci-
 lados en N, y las amidas correspondientes tales como por
 ejemplo, las N-acil-treonilvalileucinamidas.

20 La esquizofrenia es la más grave de todas las
 enfermedades mentales que el siquiatra debe tratar. La
 tasa de incidencia es de aproximadamente 1 en 1000, y la
 tasa de prevalencia es aproximadamente 1%. Es responsa-
 25 ble del 20 al 50% de todas las admisiones en hospitales
 estatales para los servicios de enfermedades mentales y
 siquiátricos en los hospitales generales (KolB, Modern
 Clinical Psychiatry, p.p. 311-312, 1973).

30 La mayoría de los pacientes que desarrollan es-
 ta enfermedad tienen un comienzo que es lento e insidioso,
 aunque un pequeño porcentaje de pacientes puede tener un

1 comienzo agudo. La enfermedad se caracteriza por una per-
turbación en las respuestas emocionales con expresiones
lentas o inapropiadas; por una perturbación en el pensa-
5 miento caracterizada por incapacidad para alcanzar una
idea final, por fragmentación, por una perturbación en
asociaciones, bloqueo, neologismos, etc; por una elimina-
ción del medio ambiente y una preocupación por pensamien-
tos internos; por una pérdida de la capacidad para exper-
10 imentar placer; y más frecuentemente por perturbaciones
en la percepción como se manifiesta ampliamente en aluci-
naciones y decepciones.

Desgraciadamente, la esquizofrenia comienza más
frecuentemente en la adolescencia tardía o en la edad
adulta temprana y, a pesar del empleo de medicamentos an-
15 ti-síquicos, persiste incapacitando al individuo más o me-
nos durante la vida del individuo.

Actualmente hay pruebas considerables de que es-
ta enfermedad es un estado genéticamente determinado aun-
que, indudablemente, los factores ambientales, particular-
20 mente las experiencias de la vida tempranas, muy proba-
blemente son también importantes. Parece ser sin duda
que existe una perturbación metabólica básica que se des-
cribiré con detalle en la presente memoria.

Desgraciadamente, no puede probarse absoluta-
25 mente que haya un modelo animal para los estudios esqui-
zofrénicos puesto que no se puede conversar con el animal
para establecer que es un esquizofrénico. Los monos Ma-
caco privados maternal y sensorialmente en el Wisconsin
Primate Laboratory tienen un comportamiento alterado (si en-
30 do miedosos, agresivos hacia ellos mismos e incapaces de

•••••

1 funcionar sexualmente), con lo que, están próximos en com-
portamiento a los pacientes con esquizofrenia (Harlow,
"The Development of Patterns of Affection" Thomas William
5 Salmon Lectures, New York Academy of Medicine, New York
Diciembre, 1960). Han sido estudiados los monos privados
más fuertemente y muestran una perturbación en una alfa-
-2-globulina, descrita en la presente memoria, de su san-
gre similar a la perturbación que caracteriza a los pa-
cientes (Beckett, Frohman et al., "Schizophrenic-like Me-
10 chanisms in Monkeys", The American Journal of Psychiatry,
119:835-842,1963).

Además, estos monos también demostraron pertur-
baciones electro-encefalográficas, particularmente del
septum del cerebro, similar a las que se han descrito pre-
15 vviamente como características de pacientes con esquizo-
frenia, (Heath, "Electroencephalographic Studies in Inso-
lation-raised Monkeys with Behavioral Impairment", Disea-
ses of the Nervous System, 33:157-163, 1972).

Por lo tanto el empleo de animales ha sido prin-
20 cipalmente para demostrar la presencia de sustancias me-
tabólicas anormales en la sangre de pacientes con esqui-
zofrenia. Cuando una proteína sanguínea anormal se da a
ratas en un premio de alimento, en una situación de tre-
par cuerdas, las ratas se comportan de un modo considera-
25 blemente más lento en su realización (Bergen et al, "Fur-
ther Experiments with Plasma Proteins from Schizophre-
nics". In: Serological Fractions in Schizophrenia, edi-
tado por R.E. Heath, p. 67, Paul B. Hoeber, Inc., Medi-
cal Book Department of Harper & Row, New York, 1963).

30 Existen algunas pruebas de que extractos del

1 sistema límbico del cerebro de pacientes que han muerto,
cuando se inyectaron en voluntarios normales, producen
una reacción esquizofrénica simulada (Garey, "Focal Elec-
5 troencephalographic Changes Induced by Anti-septal Anti-
bodies", Biological Psychiatry, 8:75-88, 1974). Los es-
tudios más consistentes implican la inyección de la alfa-
-2-globulina aislada de la sangre de pacientes esquizo-
frénicos en cantidades de microlitros, en ventrículos de
10 ratas a las que se han implantado electrodos en el haz
del cerebro anterior mediano. Las ratas así implantadas
disfrutarán presionando una barra tan frecuentemente como
puedan a costa de toda otra actividad. Cuando se inyec-
tan cantidades microscópicas de la alfa-2-globulina ais-
lada en los ventrículos, hay una reducción en la presión
15 de la barra que no ocurre cuando se inyecta la sustancia
comparable de un individuo testigo. Algunas de las ra-
tas inyectadas con la proteína sanguínea aislada esquizo-
frénica puede rondar la barra en equilibrio como si pre-
sionara la barra, quedando atrapada e incapaz de conti-
20 nuar, simulando un estado motor perturbado esquizofrénico.
La interpretación de la reducción en la presión de
la barra es que el animal ha perdido su capacidad para
experimentar placer como caracteriza a los pacientes es-
quizofrénicos (Caldwell et al, "The Effects of the S-pro-
25 tein on Intracranial Self-Stimulation in the Rat", Biolo-
gical Psychiatry, 8:235-244, 1974).

El autor del presente invento ha estado intima-
mente ocupado durante muchos años en esfuerzos de inves-
tigación considerables dedicados a determinar la causa
30 de la esquizofrenia en términos de bioquímica, y para de-

1 terminar modos psicofarmacológicos para su tratamiento. En
este trabajo se ha encontrado que una proteína de peso mo-
lecular elevado, estimada que tiene un peso molecular de
aproximadamente 263.000 y que es aproximadamente 80% de
5 lípidos, es más activa en los esquizofrénicos que en los
individuos normales, y cuanto más rápidamente empeora un
esquizofrénico, más activa es la proteína. Esta proteína
ha sido clasificada como una alfa-2-globulina, y se ha de-
nominado la S-proteína; Frohman, C.E.; Latham, L.K.; Bec-
10 kett, P. G. S.; y Gottlieb, J. S.; "Biochemical Studies
of a Serum Factor In Schizophrenia", Molecular Basis of
Some Aspects of Mental Activity, Vol. 2, Walaas, O., Ed.,
pp. 241-255, Academic Press, New York (1967); y Frohman,
C. E., "Studies on the Plasma Factors in Schizophrenia",
15 Mind as a Tissue, Rupp, C., Ed., pp. 181-195, Hoeber Med.
Div., Harper & Row, New York. La S-proteína cuando se
administra a, por ejemplo ratas, bloquea el disfrute de
estímulos de placer en las ratas, pero no altera aparente-
mente su respuesta a la evitación.

20 Los esfuerzos para reducir la actividad de la
S-proteína en esquizofrénicos han incluido obtener ex-
tractos de cerebros, por ejemplo cerebro de ganado vacu-
no, glándulas pineales de bueyes, etc, en la búsqueda de
materiales que controlen el nivel o actividad de la S-pro-
25 teína. Frohman, et al, en "Control of the Plasma Factor
in Schizophrenia, Recent Advances in Biological Psychia-
try, Volume 7, pp. 45 to 51, 1964, describían que una pro-
teína aislada de los tejidos animales contrarrestaba la
actividad de la S-proteína. Esta proteína ha sido deno-
30 minada la anti-S-proteína y se encuentra tanto en los

1 tejidos humanos como de animales. En los esquizofrénicos
la S-proteína se encuentra en una conformación alfa-heli-
coidal, mientras que en las personas normales predomina
5 la S-proteína como una cadena al azar o una conformación
beta-helicoidal. La producción de cantidades terapéuti-
cas de la anti-S-proteína implica grandes dificultades y
gastos elevados, y su extracción para empleo médico ge-
neral es impracticable. Por lo tanto, la producción de
10 unos cuantos miligramos de la anti-S-proteína del ganado
vacuno requeriría el sacrificio de, aproximadamente,
100.000 reses. Por tanto, el suministro natural de la en-
ti-S-proteína es claramente insuficiente para tratar más
de unos cuantos individuos y entrañaría un gasto intole-
rable. Otras publicaciones que se refieren a estos estu-
15 dios anteriores incluyen las siguientes y las citadas en
ellas: Frohman, C.E.; Arthur, R. E.; Yoon, H. S. y Gott-
lieb, J. S.; "Distribution and Mechanism of Action of the
Anti-S-Protein in Human Brain", Biological Psychiatry,
Vol. 7, No. 1, pp. 53 to 61, 1973; y Harmison, C. R. y
20 Frohman, C. E., "Conformational Variation in a Human Plas-
ma Lipoprotein", Biochemistry, Vol. 11, No. 26, pp. 4485-
-4493, 1972.

También se ha observado en estudios en los que
ha estado implicado el autor del presente invento que la
25 anti-S-proteína extraída en un antígeno. Aunque la es-
quizofrenia puede ser suprimida drásticamente por admi-
nistración inicial de la anti-S-proteína a un paciente,
la anti-S-proteína es inactivada rápidamente por la pro-
ducción de anticuerpos, y la anti-S-proteína administra-
30 da subsiguientemente puede ser tan rápidamente inactivada

1 que no proporcione ningún efecto discernible en el trata-
miento de la esquizofrenia. El autor del presente inven-
to ha estado implicado en intentos para romper la anti-S-
-proteína en fragmentos que puedan tener una actividad
5 aceptable al tratar la esquizofrenia sin presentar la ac-
tividad antigena indeseable.

De acuerdo con el presente invento, la diges-
tión de la anti-S-proteína con por ejemplo, pepsina y
tripsina, para proporcionar pequeños péptidos de un peso
10 molecular menor de aproximadamente 1000, proporciona una
fracción que contiene tripéptidos que se ha encontrado
que son activos en reducir la actividad indeseada de la
S-proteína. El tripéptido presenta actividad para origi-
nar la conversión de la S-proteína alfa-helicoidal a su
15 conformación de cadena al azar. Este tripéptido se ha
caracterizado como treonil-valil-leucina. Se ha empre-
nido un trabajo para sintetizar este tripéptido, y se ha
obtenido una forma sustancialmente pura, es decir, cris-
talina, del tripéptido. Este tripéptido presenta activi-
20 dad frente a la S-proteína de los esquizofrénicos, es de-
cir, la conformación alfa-helicoidal de la S-proteína se
convierte en la forma al azar. Cuando se administra en
ensayos para contrarrestar el efecto de la S-proteína a
ratas el período de eficacia del tripéptido es sin embar-
25 go, de corta duración, por lo que se requerirían dosis
periódicas frecuentes del tripéptido en cualquier trata-
miento eficaz de la esquizofrenia.

Por el presente invento, se ha encontrado tam-
bién que los péptidos T-V-L- y sus derivados pueden em-
30 plearse para aliviar los síntomas esquizofrénicos en ma-

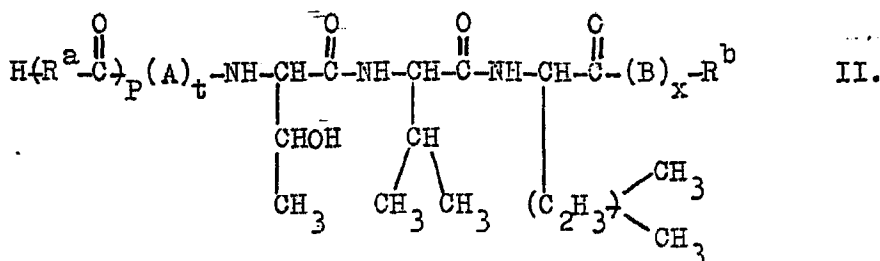
1 miferos afligidos con dichos síntomas. Estos materiales
polipeptídicos contienen los residuos de al menos tres
2 alfa-aminoácidos y tienen la estructura T-V-L definida
anteriormente en la presente memoria. El polipéptido pue-
5 de ser un aminoácido, es decir, que tiene un resto amino-
ácido terminal en forma ácida y el otro resto aminoácido
terminal en forma alfa-amino ($-NH_2$). Sin embargo, se pre-
fiere que los materiales polipeptídicos empleados para
aliviar los síntomas de la esquizofrenia contengan al me-
10 nos uno de sus restos aminoácidos finales en forma de de-
rivado, especialmente el grupo alfa-amino-terminal que
esté sustituido por acilo o el grupo ácido carboxílico
terminal que esté en forma de amida o de éster. Preferi-
blemente ambos de estos restos terminales están sustitui-
15 dos de tal forma, y se prefieren particularmente las ami-
das aciladas. Estos materiales polipeptídicos pueden es-
tar también sustituidos adicionalmente, y los derivados
no tóxicos farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sa-
les de ácidos o bases, de los polipéptidos o sus formas
20 derivadas pueden emplearse para aliviar los síntomas de
esquizofrenia de acuerdo con este invento.

Los materiales polipeptídicos que contiene
T-V-L del presente invento son aparentemente eficaces en
el tratamiento de síntomas esquizofrénicos haciendo que
25 la configuración alfa-helicoidal de la S-proteína presen-
te en el sistema interno, por ejemplo, el cerebro, del
esquizofrénico, asuma su forma estructurada al azar. Los
polipéptidos o polipéptidos acilados, sus ésteres o ami-
das tienen la estructura:

30

1

5



10

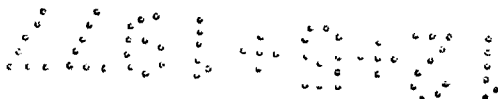
15

20

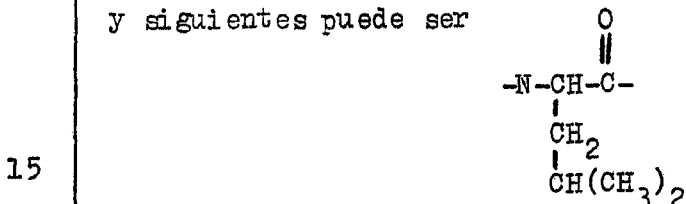
25

30

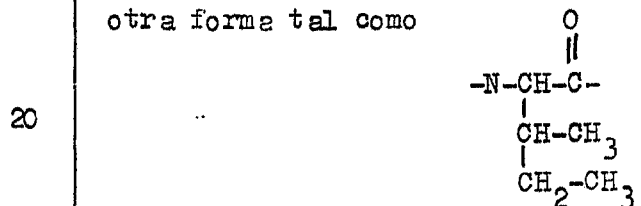
en la que R^a es un grupo hidrocarbonado alifático saturado, por ejemplo alcoholeno, de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, preferiblemente alcoholeno inferior, es decir de 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono; R^b es -O(R^e) en el que R^e es hidrógeno o un grupo hidrocarbonado alifático saturado, por ejemplo, alcoholo, de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, preferiblemente alcoholo inferior, es decir de 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono, o arilo o aralcoholo de 1 a aproximadamente 4 anillos, preferiblemente de 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono, o R^b es -NR^cR^d en donde R^c y R^d pueden ser iguales o diferentes y pueden ser hidrógeno o alcoholo inferior, por ejemplo 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono o R^c y R^d pueden ser alcoholeno inferior y formar juntos una estructura cíclica que incluye el átomo de nitrógeno al que están unidos; A y B son cada uno un radical monoiminoacilo, preferiblemente un radical α-monoiminoacilo, que contiene de 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, y B es hidrolizable a partir del componente (L) de la estructura T-V-L esencial de tal modo que la función carboxilo del componente (L) se hace disponible en el huésped; p es 0 ó 1; t es de 0 a aproximadamente 5; x es de 0 a aproximadamente 5; y t más x es de 0 a aproximadamente 5.



1 Cuando t es 2 o mayor, cada A puede ser igual o diferente,
 así $(A)_t$ puede ser, por ejemplo, fenilalanilprolilo. De modo similar,
 cuando x es 2 o mayor, cada B puede ser igual o diferente. En un grupo preferido de compuestos,
 5 $-R^b$ es $-NR^cR^d$ o al menos uno de p , t o x es distinto de 0. El componente (T) mostrado en las fórmulas estructurales anteriores y siguientes puede estar bien en forma diastereoisómera, por ejemplo, como treonilo o alotreonilo en donde está invertida la estereoquímica en el carbono β . Preferiblemente, el componente (T) es treonilo. El componente (L) en las fórmulas estructurales anteriores y siguientes puede ser



(denominado comúnmente leucilo), que se prefiere, o en otra forma tal como



como en isoleucilo.

25 Los compuestos de este invento incluyen compuestos en los que cualquier sustituyente, es hidrolizable, por ejemplo el radical monoiminoacilo designado en la presente memoria por B, en el grupo carboxílico del resto (L) en la secuencia T-V-L esencial. Ventajosamente, con el
 30 fin de proporcionar la actividad deseada el sustituyente

1 es hidrolizable en las presentes condiciones en el medio
deseado en un anfitrión. Los sustituyentes hidrolizables
adecuados son aquellos que se hidrilizan en presencia de
glóbulos rojos a una temperatura de incubación de aproxi-
5 madamente la temperatura del cuerpo de un anfitrión, por
ejemplo aproximadamente 35 a 40°C. Un procedimiento con-
veniente para determinar si un sustituyente es o no hidro-
lizable implica la incubación del compuesto que contiene
la estructura T-V-L esencial y un sustituyente en el res-
10 to (L) en un medio vividor a aproximadamente 37°C.

Los restos peptídicos en los compuestos de es-
te invento incluyen restos peptídicos que poseen activi-
dad óptica. Varios restos peptídicos pueden tener confi-
guraciones diseñadas como L o D. Los radicales monoimi-
15 noacilos que comprende A de fórmula II y la parte T-V-L
esencial de los compuestos pueden estar en la forma L o
D o en una de sus mezclas tal como mezclas racémicas. De-
bido a la frecuente dificultad en la hidrólisis de los
péptidos de forma D que son sustituyentes en las funcio-
20 nes carboxilo de los péptidos para proteger la función
carboxílica, ventajosamente los radicales monoiminoacilos
que comprenden B de fórmula II pueden no tener actividad
óptica o, cuando son ópticamente activos, pueden estar en
la configuración L. Entre los compuestos preferidos es-
25 tán aquellos en los que (L) de la secuencia T-V-L esencial
es de la configuración D.

El tripéptido, treonil-valil-leucina, o sus de-
rivados descritos en la presente memoria, por ejemplo las
amidas correspondientes, pueden obtenerse con pureza re-
30 lativamente elevada, y pueden ser cristalinos, por ejem-

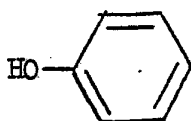
1 en la que el grupo $\left(\text{NH}-\underset{\text{R}^1}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right)$ es un radical monoiminoacilo

5 y R^1 es, por ejemplo, hidrógeno o un grupo alcoholo inferior, por ejemplo de 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono, o un grupo $\underset{\text{R}^3}{\text{CH}}-\text{OR}^2$ en el que R^2 y R^3 son hidrógeno

10 o alcoholo inferior, es decir de 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono, o arilo o aralcoholo de 1 a aproximadamente 4 anillos, teniendo preferiblemente de 6 a aproximadamente 24 átomos de carbono. Tales grupos pueden estar sustituidos como en el caso de por ejemplo tirosilo. Las letras R^a , R^b , p, t y x tienen el mismo significado que en
15 la fórmula II.

En los compuestos ilustrados por la fórmula III, R^1 es parte de un resto o residuo de alfa-aminoácido o peptídico como en el caso de, por ejemplo, treonilo o alotreonilo en los que R^1 es un grupo alfa-hidroxi-etilo, leucilo en el que R^1 es un grupo 2-metilpropilo, valilo en el que R^1 es un grupo isopropilo, serilo en el que R^1 es un grupo hidroximetilo, isoleucilo en el que R^1 es un grupo 1-metilpropilo, glicilo en el que R^1 es hidrógeno, o alfa-alanilo en el que R^1 es metilo, arginilo en el que R^1

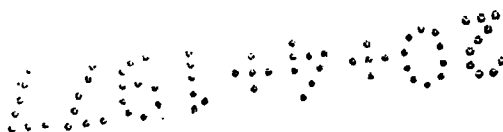
25 es $\text{NH}=\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-$, tirosilo en el que R^1 es

30 , y similares. Cuando el grupo que in-

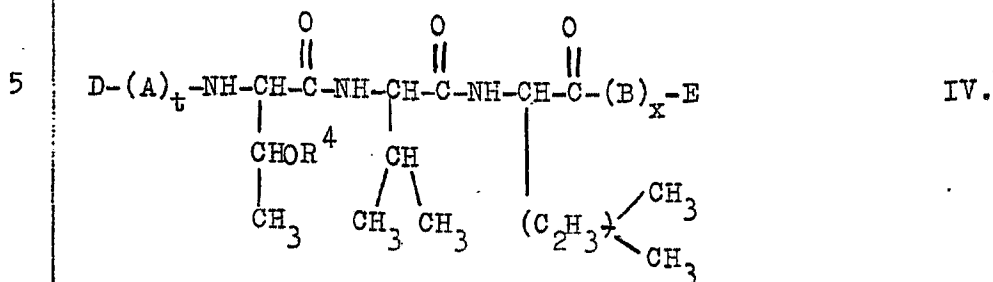
1 cluye R^1 tiene un grupo alfa-hidroxi puede convertirse en
un grupo alcoxi o ariloxi inferior, preferiblemente benci-
loxi o t-butiloxi. Esto puede hacerse durante la síntesis
5 para proteger la función hidroxilo. Los restos peptídicos
es decir, radicales monoaminoacilos, unidos a la estruc-
tura T-V-L esencial pueden también ser prolilo, arginilo
y similares. También estos restos pueden ser un resto de
ácido dicarboxílico tal como un residuo del ácido glutá-
mico o aspártico.

10 El grupo R^a en los compuestos descritos en la
presente memoria pueden tener hasta aproximadamente 20 áto-
mos de carbono, aunque es deseable que sea alcohileno de
hasta aproximadamente 4 átomos de carbono. Por tanto, el
grupo N-acilo $H(R^a-C)$, puede ser por ejemplo acetilo, pro-
15 panoilo, butinoilo, pentanoilo, hexanoilo, heptanoilo, oc-
tanoilo, nonanoilo, decanoilo, undecanoilo, dodecanoilo,
tridecanoilo, tetradecanoilo, pentadecanoilo, palmitoilo,
heptadecanoilo, estearilo y similares. El grupo éster,
 R^b , puede ser metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo,
20 hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodeci-
lo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, heptadecilo, oc-
tadecilo, fenilo, bencilo, butoxicarbonilo terciario, bu-
tilo terciario, dihidro-epi-hidroxi-androsteronilo, y si-
milares. Preferiblemente, el grupo N-acilo y el grupo és-
25 ter son normales y por tanto tienen cadenas de carbono a
carbono lineales. Los compuestos de las fórmulas o sus
compuestos intermedios precursores pueden tener grupos sus-
tituyentes que no interfieren con la actividad química o
farmacológica deseada de los materiales.

30 Los compuestos intermedios para preparar los

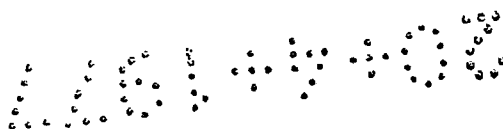


1 compuestos activos de este invento incluyen compuestos de
la fórmula



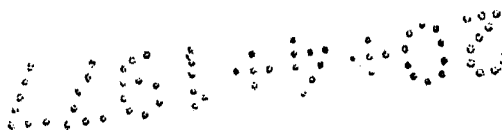
10 en la que t, x, A y B son como se han definido antes; D
es H o un grupo protector de α -amino; E es -OH; un grupo
protector carboxílico terminal; un complejo de metal, por
ejemplo zinc, cobre, níquel, cobalto, hierro, magnesio o
aluminio, siendo preferiblemente el complejo un complejo
15 de un hidróxido de metal; o una sal de adición de ácido o
base; R⁴ es H, hidrocarburo alifático, preferiblemente
saturado, por ejemplo, alcohol de 1 a aproximadamente 20
átomos de carbono tal como alcohol inferior de aproxima-
damente 1 a 4 átomos de carbono, o aralifático o arilo de
20 1 a aproximadamente 4 anillos, preferiblemente de 6 a
aproximadamente 24 átomos de carbono; acilo que incluye
alcanoilo o aralcanoilo de 1 a aproximadamente 20 átomos
de carbono, preferiblemente acilo acíclico inferior de 1
a aproximadamente 4 átomos de carbono; tetrahidropirani-
25 lo; un metal monovalente tal como un metal alcalino, por
ejemplo sodio; y similares. Un metal tal como zinc, co-
bre, níquel, cobalto, hierro, magnesio o aluminio pueden
formar un complejo con funciones del polipéptido tal como
una función carbonílica.

30 Los grupos protectores de α -amino pueden ser



1 (1) del tipo acilo o tioacilo, preferiblemente de 2 a apro-
ximadamente 21 átomos de carbono, por ejemplo, acilo alifá-
tico inferior de 2 a aproximadamente 7 carbonos, por ejem-
5 plo, acetilo, etc; acilo aralifático inferior de 8 a apro-
ximadamente 15 átomos de carbono, tal como ftalilo, naf-
toilo, benzoilo, etc; trifluoroacetilo; cloroacetilo;
γ-clorobutirilo; toluensulfonilo; benceno sulfonilo; nitro-
fenilsulfenilo; tritilsulfenilo; o-nitrofenoxiacetilo; y
similares; (2) grupos protectores del tipo uretano aromá-
10 tico ilustrados por benciloxicarbonilo y benciloxicarbonilo
sustituído tal como p-clorobenciloxi-carbonilo, p-nitro-
benciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, p-metoxi-
benciloxicarbonilo; (3) grupos protectores de uretano ali-
fático ilustrados por terc-butiloxicarbonilo, diisopropil-
15 metoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo,
aliloxicarbonilo; (4) grupos protectores del tipo cicloal-
cohol-uretano ilustrados por ciclopentiloxicarbonilo, ci-
clohexiloxicarbonilo; (5) grupos protectores del tipo tio-
-uretano tal como feniltiocarbonilo; (6) grupos protecto-
20 res del tipo alcohol y aralcohol como se ilustra por
trifenilmetilo (tritilo) y bencilo; (7) grupos trialcohol-
silano tales como trimetilsilano.

Los grupos protectores carboxílicos terminales
pueden ser (1) -OG en el que G es, por ejemplo, un resto
25 alifático que tiene preferiblemente 1 a aproximadamente
20 átomos de carbono, o un resto aralifático de 1 a apro-
ximadamente 4 anillos, teniendo preferiblemente 6 a apro-
ximadamente 24 átomos de carbono, y proporcionando un és-
ter terminado con un radical que contiene carbono; o aci-
30 lo, por ejemplo acilo acíclico inferior que tiene preferi-



1 blemente 1 a aproximadamente 6 carbonos; (2) una función
 que proporciona amida, por ejemplo, $-\text{NH}_2$, aminoalifático
 o aminoaralifático (por ejemplo, aralifático monocíclico)
 de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono, por ejemplo,
 5 la amina puede ser primaria, secundaria o terciaria, por
 ejemplo, $-\text{NR}^{\text{C}}\text{R}^{\text{d}}$ en la que R^{C} y R^{d} son como se han defini-
 do antes; o (3) un agente de sujeción tal como el soporte
 de resina $-\text{NH} - \text{CH} - \text{C}_6\text{H}_4 -$; el soporte de resina



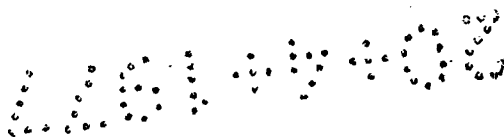
10 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-$, resina clorometilada, resina hidroximetili-
 ca, resina de Merrifield y similares. Preferiblemente,
 los grupos alifáticos o aralifáticos anteriores son hidro-
 carbilo.

15 Los materiales polipeptídicos de este invento,
 por ejemplo, compuestos de fórmula II pueden emplearse
 para aliviar los síntomas de esquizofrenia en seres huma-
 nos y otros mamíferos, y se cree que esto se consigue re-
 duciendo la actividad de la S-proteína, es decir, origi-
 20 nando una reducción en el grado de conformación alfa-heli-
 coidal de la S-proteína en los animales de sangre calien-
 te. Estos compuestos activos pueden ser eficaces en con-
 trarrestar los síntomas de esquizofrenia y sus formas ma-
 nifiestas tales como estados de tensión con ansiedad, si-
 25 cosis depresiva maníaca, etc, cuando se administra farma-
 cológicamente de modo interno a un animal vivo. La admi-
 nistración de un compuesto activo de este invento, por
 ejemplo, mezclado con un excipiente farmacéutico puede
 ser interna, por ejemplo, puede ser dentro del tracto di-
 30 gestivo y se prefiere la administración parenteral. El

1 compuesto activo puede estar en forma sólida o líquida y
puede estar combinado con un excipiente farmacéuticamente
aceptable como un sólido, una solución, suspensión o emul-
sión u otra forma. La administración parenteral puede ser
5 por ejemplo por rutas subcutánea, intraperitoneal, intra-
venosa, intra-arterial, intramuscular o similares. Para
la administración oral, un compuesto activo y un excipien-
te farmacéuticamente aceptable puede tomar, por ejemplo
la forma de una píldora, pastilla, tableta, cápsula o una
10 suspensión líquida. Ejemplos de excipientes son sólidos
tales como lactosa, estearato de magnesio, estearato de
calcio, almidón, tierra de pipa fosfato dicálcico, saca-
rosa, talco, ácido esteárico, gelatina, agar, peptina o
acacia, y líquidos tales como aceite de sésamo, aceite de
15 oliva, agua y similares. También puede emplearse un re-
vestimiento entérico, tal como acetato-italato de celulo-
sa. Las composiciones de este invento pueden incluir tam-
bién agentes conservadores, agentes estabilizadores, agen-
tes humectantes, agentes emulsificadores, tampones o sa-
20 les y similares. Los compuestos activos empleados en el
método del invento, o composiciones que los contienen,
pueden administrarse junto con o incluyendo otros mate-
riales fisiológicamente activos y/o medicamentos, por
ejemplo agentes de tampón, antiácidos, sedantes, tranqui-
lizantes, analgésicos, hormonas o similares.
25

Pueden emplearse varias dosificaciones de com-
puestos activos dependiendo del compuesto activo particu-
lar empleado, la gravedad del estado que ha de tratarse,
el modo de administración, el grado de efecto deseado en
30 el huésped, por ejemplo, mamíferos y similares. Así, la

1 que puede reaccionar además para obtener la estructura de-
seada que tiene de 3 a aproximadamente 8 unidades o res-
tos aminoácidos. Para obtener la combinación deseada de
5 restos aminoácidos, generalmente es oportuno bloquear los
lugares en los aminoácidos que puedan conducir, a una
reacción secundaria indeseable, por ejemplo, la función
carboxílica de un primer reactivo aminoácido con una fun-
ción amina de una primera o segunda molécula de aminoáci-
do. El bloqueo puede efectuarse por medios convenciona-
10 les. Grupos de bloqueo particularmente ventajosos para
la función amina de los aminoácidos son los grupos pro-
tectores de α -amino, por ejemplo, grupos ftalilo, car-
bobenciloxi y t-butiloxicarbonilos en los que puede unir-
se fácilmente el grupo amina sin originar racemización
15 del aminoácido, debe ser relativamente inerte en las con-
diciones de reacción, y debe separarse fácilmente del gru-
po amina sin afectar adversamente al aminoácido. Estos
grupos protectores pueden hacerse reaccionar en forma del
haluro de ácido, por ejemplo cloruro, éster o anhídrido
20 de ácido, por ejemplo, anhídrido de ácido mixto con for-
miato de alcohol, por ejemplo un formiato de alcohol
inferior del grupo de bloqueo. La reacción puede prose-
guir a temperaturas ambientes en un disolvente líquido
orgánico e inerte tal como benceno. Sin embargo, pueden
25 emplearse si se desean temperaturas más altas o más bajas
por ejemplo aproximadamente 0° a 50°C. La función carbo-
xílica del aminoácido puede bloquearse por reacción con
el grupo amina del aminoácido precedente en la serie pep-
tídica o por otro grupo de bloqueo susceptible cuando el
30 ácido es el ácido inicial en la serie.



1 Con el fin de facilitar la recuperación del pro-
ducto de la síntesis de aminoácido después de cada etapa
de la reacción, puede ser bastante ventajoso proporcionar
el resto aminoácido inicial o terminal como un éster re-
5 sínico o una amida resínica. Resinas particularmente úti-
les son por ejemplo resina de benzihidrilamina, resina
clorometilada, resina de Merrifield, y resina de hidrox-
metilo. La preparación de una resina de benzihidrilamina
está descrita por Rivallile, et al, Helv. 54, 2772 (1971),
10 y la preparación de una resina de hidroximetilo está des-
crita por Bodenszky et al Chem. Ind. (London) 38, 1597-98
(1968).

 Los grupos de bloqueo deben ser estables en el
reactivo y en las condiciones de reacción para preparar
15 el péptido. Los grupos de bloqueo para el grupo de ácido
carboxílico terminal deben ser estables en las condicio-
nes empleadas para separar el grupo protector de alfa-ami-
no en cada etapa de la síntesis. El grupo de bloqueo de-
be retener sus propiedades protectoras, es decir, no es-
20 cindirse en las condiciones de síntesis, y cuando se se-
para al terminar la síntesis las condiciones de reacción
empleadas no deben alterar la cadena peptídica de un modo
indeseado. Los grupos de bloqueo pueden separarse por
varios métodos convencionales, dependiendo de la natura-
25 leza del grupo que ha de separarse, por ejemplo, en pre-
sencia de ácido trifluoroacético, o por hidrogenolisis,
por ejemplo con hidrógeno y un catalizador tal como pla-
tino, paladio o similares, o con bromuro de hidrógeno en
ácido acético glacial o ácido trifluoroacético o con áci-
30 do fluorhídrico anhidro. El medio de hidrogenolisis es

1 preferiblemente y de modo esencial anhidro.

La reacción entre una unidad peptídica existen-
te y un aminoácido subsiguiente puede realizarse por reac-
ción en fase sólida. Al preparar los ésteres o amidas re-
sínicas, el soporte de resina y el aminoácido pueden mez-
5 clarse íntimamente en un disolvente orgánico inerte, por
ejemplo, tetrahidrofurano, dioxano, dimetilformamida, ben-
ceno, etanol y similares. La reacción prosigue a tempera-
tura ambiente, aunque pueden emplearse si se desean tempe-
10 raturas más altas y más bajas, por ejemplo aproximadamen-
te 0° a 80°C. Generalmente se deja que la reacción lle-
gue esencialmente a completarse para hacer máximo el ren-
dimiento de producto peptídico que tiene el orden deseado.
El empleo de excesos sustanciales de reactivos aminoáci-
15 dos, por ejemplo al menos aproximadamente 1,5 a aproxima-
damente 200 o más veces la cantidad requerida para la re-
acción en una base estequiométrica, y tiempos de reacción
sustanciales, por ejemplo al menos aproximadamente 1 hora,
preferiblemente al menos aproximadamente 5 horas a 500 o
20 más horas, permiten completar la reacción. El grado en
que se ha completado la reacción puede determinarse por
la reacción de color de Kaiser. Una reacción positiva
a la reacción de color de Kaiser indica lugares sin sus-
tituir en el aminoácido. Una valoración de Dorman puede
25 también emplearse para determinar si ha finalizado la re-
acción.

Los métodos de unión adecuados para proporcio-
nar la cadena polipeptídica de los compuestos de este in-
vento están descritos en la bibliografía. En general,
30 los fragmentos de aminoácidos y/o peptídicos se unen de

2025

1 modo, por ejemplo, que un aminoácido o un péptido que con-
tenga un grupo alfa-amino protegido y un grupo carboxilo
terminal se hace reaccionar con un aminoácido o péptido
que contenga un grupo alfa-amino libre y un grupo carboxi-
5 lo terminal protegido, o un aminoácido o péptido que con-
tenga un grupo alfa-amino activo y un grupo carboxílico
terminal protegido se hace reaccionar con un aminoácido
o un péptido que contenga un ácido carboxílico terminal
libre y un grupo alfa-amino protegido. El grupo carboxí-
10 lico puede activarse por ejemplo por conversión en una
azida de ácido, anhídrido o imidazolida o en un éster ac-
tivado tal como éster cianoetilico, éster tiofenílico,
éster p-nitrotiofenílico o éster de tiocresilo, p-metano-
sulfonilfenilo, p-nitrofenilo, 2,4-dinitrofenilo, 2,4,5-
15 ó 2,4,6-triclorofenilo, pentaclorofenilo, N-hidroxi succi-
nimida, N-hidroxi ftalimida, 8-hidroxi quinoleína, éster
de N-hidroxipiperidina, o por reacción con una carbodi-
imida (opcionalmente con adición de N-hidroxi-succinimida)
ó N,N'-carbonildiimidazol o una sal de isoxazolio, por
20 ejemplo, el reactivo de Woodward, el grupo amino por ejem-
plo por reacción con un fosfito. Los métodos empleados
frecuentemente incluyen el método de la carbodiimida, el
método de Veygand-Wuensch (carbodiimida en presencia de
N-hidroxi succinimida), el método de la azida, el método
25 de los ésteres activados y el método del anhídrido, tam-
bién el método de Merrifield y el método de los N-carbo-
xi anhídridos o N-tiocarboxi anhídridos.

Convenientemente, puede emplearse el método de
la carbodiimida, el agente de copulación de carbodiimida
30 puede ser por ejemplo N-etil-N'-(γ -dimetilaminopropil-

1 -carbodiimida) o una dihidrocarbíl-carbodiimida, por ejem-
plo dialcohilo de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbo-
no, por ejemplo díciclohéxil-carbodiimida. La carbodi-
5 mida puede proporcionarse en un disolvente inerte, por
ejemplo, cloruro de metileno, para ayudar en la manipula-
ción. Frecuentemente, la relación molar de carbodiimida
a moles de reactivo de aminoácido menos abundante es apro-
ximadamente 0,9:1 a 10:1. La reacción de unión puede rea-
lizarse en un medio inerte, por ejemplo, diclorometano,
10 en cantidades que proporcionan disolventes, por ejemplo,
al menos aproximadamente 1 a aproximadamente 100 o más mi-
lilitros por gramo de aminoácido. La reacción transcurre
a temperatura ambiente, aunque pueden emplearse, si se de-
sean, temperaturas más altas y más bajas, por ejemplo apro-
15 ximadamente - 30° a 50°C.

El desbloqueo de un fragmento de aminoácido o
péptido para una reacción posterior puede realizarse de
cualquier forma conveniente, y dichos métodos son bien co-
nocidos. Ventajosamente, los agentes de bloqueo en los
20 grupos amino, por ejemplo, grupos de bloqueo de tipo acilo
pueden separarse en un procedimiento de dos etapas, em-
pleando un haluro de hidrógeno, por ejemplo cloruro de hi-
drógeno, en cada etapa. El producto resultante es la sal
de adición de ácido, por ejemplo sal de cloruro de hidró-
25 geno, que puede neutralizarse con una base, por ejemplo,
trietilamina, piridina, hidróxido de sodio o potasio, car-
bonato de sodio o potasio o similares. El haluro de hi-
drógeno puede prepararse burbujeando el haluro de hidró-
geno en un medio líquido, por ejemplo, dioxano o cloruro
30 de metileno. Un éster resínico puede convertirse en un

1 péptido desbloqueado burbujeando haluro de hidrógeno ga-
seoso, por ejemplo, bromuro de hidrógeno, a través de un
medio que contiene el éster resínico del péptido y ácido
trifluoroacético.

5 Como se ha observado antes, es deseable modifi-
car el polipéptido que contiene la unión T-V-L- para pro-
porcionar un compuesto que presente una vida eficaz más
larga en el tratamiento de los síntomas esquizofrénicos
que el tripéptido de aminoácidos, y así, este polipéptido
10 puede convertirse en un polipéptido omega-N-acilado. Pue-
den emplearse procedimientos de acilación conocidos aun-
que puede ser más deseado emplear un procedimiento que no
perturbe la actividad óptica de los restos de aminoácidos.
El grupo alfa-amino del polipéptido puede acilarse por
15 reacción con el haluro de ácido correspondiente, por ejem-
plo haluro de ácido, anhídrido de ácido, o similares, em-
pleando métodos convencionales. El grupo de ácido carbo-
xílico o éster terminal puede esterificarse o transeste-
rificarse de acuerdo con procedimientos convencionales pro-
20 porcionando un péptido que pueda presentar una dosis efi-
caz mayor. La esterificación puede efectuarse por reac-
ción del polipéptido que tiene una función carboxílica
terminal desbloqueada con el alcohol correspondiente. Las
amidas que tiene la unión T-V-L característica de las
25 composiciones de este invento pueden prepararse de acuer-
do con procedimientos conocidos. Por ejemplo, el ácido
o haluro de ácido correspondiente, por ejemplo el cloruro,
del péptido puede hacerse reaccionar con amoníaco o una
amina primaria o secundaria. El amoníaco o la amida se
30 proporciona a menudo en al menos una cantidad estequiomé-

1 trica para una reacción completa con la estructura peptí-
dica. La reacción puede realizarse en un disolvente iner-
te tal como tetrahidrofurano y puede ser convenientemente
a una temperatura de aproximadamente 10 a 50°C o superior.
5 Generalmente cuanto mayor es el peso molecular de los gru-
pos acilo y éster en el polipéptido más pequeño y más pro-
longado será su efecto en el tratamiento de los síntomas
esquizofrénicos.

Los derivados funcionales de los compuestos y
10 compuestos intermedios de este invento incluyen las sales
farmacéuticamente aceptables, incluyendo las sales de adi-
ción de ácidos y de bases, de los polipéptidos. Las sa-
les de adición de ácidos pueden obtenerse haciendo reac-
cionar el polipéptido con un ácido orgánico o inorgánico,
15 tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sul-
fúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido maleico,
ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascór-
bico, ácido benzoico, y similares. Los compuestos que
tienen la unión T-V-L pueden también estar en forma de
20 complejos metálicos preparados poniendo en contacto los
polipéptidos con una sal, hidróxido u óxido de metal es-
casamente soluble. Los metales que pueden emplearse in-
cluyen cobalto, cobre, calcio, hierro, zinc, magnesio,
sodio, potasio y amonio. Otros metales que pueden emplear-
se incluyen níquel y aluminio. Así por ejemplo, puede
25 obtenerse un complejo metálico añadiendo el polipéptido
y una sal metálica, hidróxido metálico u óxido metálico es-
casamente soluble a un medio acuoso, o añadiendo un medio
alcalino a una solución acuosa del polipéptido y una sal
30 metálica esencialmente insoluble para formar un complejo

1 de polipéptido-hidróxido metálico insoluble. Un comple-
jo de polipéptido-sal metálica insoluble puede también
prepararse in situ añadiendo a un medio alcalino acuoso
el polipéptido y una sal metálica.

5 El invento se describirá adicionalmente por los
ejemplos siguientes. En estos ejemplos, los restos pep-
tídicos que tienen actividad óptica están en la configu-
ración L a no ser que se indique otra cosa.

10 EJEMPLO 1

Preparación de p-toluensulfonato del éster bencílico de
leucina.

15 En un matraz de 200 ml de tres bocas equipado
con una trampa de Dean y Stark, un condensador de reflujo
(con tubo de secado unido) y un agitador mecánico, se lle-
van a reflujo 15 gramos (0,0789 moles) de ácido p-toluen-
sulfónico monohidratado hasta que se desprende un equiva-
20 lente de agua. En este momento se añaden 10 gramos
(0,07634 moles) de leucina y 17,0 gramos (0,15 moles) de
alcohol bencílico. La mezcla se lleva a reflujo durante
4 horas y se deja enfriar hasta la temperatura ambiente.
Los disolventes se separan a vacío y se produce un resi-
25 duo sólido y blanco. El sólido blanco se lava con éter
anhidro y se recristaliza en etanol/éter proporcionando
en tres cosechas 28,2 gramos de p-toluensulfonato del
éster bencílico de leucina (rendimiento del 94%) que tie-
ne un punto de fusión de 157-158°C (con descomposición).

30

EJEMPLO 2

Preparación de N- α -t-butiloxicarbonilvalil-leucinato de bencilo.

Se tratan aproximadamente 13,2 gramos (0,0336 moles) de leucinato-p-toluensulfonato de bencilo con bicarbonato de sodio proporcionando leucinato de bencilo, que se recupera por extracción con cloruro de metileno. En un matraz de tres bocas de 200 ml equipado con una entrada de nitrógeno gaseoso y adaptadores de salida y un agitador magnético, se disuelven 6,25 gramos (0,34 moles) de dicitclohexilcarbodiimida en 30 ml de CH_2Cl_2 anhidro recientemente destilado y el leucinato de bencilo recuperado se añade a esto. La mezcla se mantiene en una atmósfera de nitrógeno y se enfría hasta aproximadamente -30°C empleando hielo seco y tetracloruro de carbono. A la mezcla se añaden gota a gota 7,45 gramos (0,0336 moles) de N- α -t-butiloxicarbonilvalina disueltos en 50 ml de CH_2Cl_2 anhidro. La mezcla resultante se guarda a -10°C durante dos días. Después de separar un precipitado blanco resultante por filtración, la capa de cloruro de metileno se lava sucesivamente con ácido acético acuoso al 25%, solución de bicarbonato de sodio acuosa, agua y solución salina acuosa saturada. La capa orgánica se seca luego sobre MgSO_4 anhidro y el disolvente se separa a vacío. El residuo se recoge en acetato de etilo se filtra, y se concentra de nuevo a vacío. El sólido blanco resultante se recristaliza en etanol/hexano proporcionando en dos cosechas 9,17 gramos de N- α -t-butiloxicarbonilvalil-

1 -leucinato de bencilo (rendimiento del 65%), que tiene un punto de fusión de 90-91°C.

5 EJEMPLO 3

Preparación de N- α -t-butiloxicarbonil-O-benciltreonil-valil-leucinato de bencilo.

10 En un matraz de tres bocas de 100 ml equipado con una entrada de gas adaptadores de salida y agitador magnético, se disuelven 4,08 gramos (0,00972 moles) de N- α -t-butiloxicarbonilvalil-leucinato de bencilo en 50 ml de ácido acético glacial. La mezcla se enfría a 5° y se burbujea cloruro de hidrógeno gaseoso a través de la mezcla durante 30 minutos. La mezcla se lleva luego hasta 15 sequedad a vacío. El polvo blanco resultante, clorhidrato de bencil-valil-leucina, se lava repetidamente con éter anhidro. El polvo se pone en suspensión en 30 ml de CH₂Cl₂, seco, se enfría a -30°C, y se trata con 1,38 ml 20 (0,010 moles) de trietilamina y se agita durante 30 minutos proporcionando una solución.

La solución de trietilamina resultante se añade luego a 1,94 gramos (0,010 moles) de dicitclóhexilcarbodiimida disueltos en 30 ml de CH₂Cl₂ anhidro recientemente 25 destilado. Esta solución se mantiene bajo atmósfera de nitrógeno y se añaden gota a gota 3,0 gramos (0,00972 moles) de N- α -t-butiloxicarbonil-O-benciltreonina disueltos en 30 ml de CH₂Cl₂ anhidro. La mezcla de reacción se mantiene a -10°C durante dos días. El precipitado blanco 30 resultante se separa por filtración, y la capa de clo-

1 -leucinato de bencilo se neutraliza proporcionando O-ben-
ciltreonilvalil-leucinato de bencilo. Se prepara una mez-
cla de hidrogenolisis que contiene el O-benciltreonilva-
lil-leucinato de bencilo, 0,5 gramos de paladio al 10% so-
5 bre carbón vegetal por 0,01 mol del material que ha de hi-
drogenarse, y etanol absoluto. A la mezcla se añade 1,1
equivalentes molares de ácido acético basado en el éster
de bencilo. La mezcla se hidrogena durante 4 horas. El
catalizador se separa por filtración y los disolventes se
10 separan a vacío. El residuo se lava con éter anhidro y
se recristaliza en una mezcla de etanol/éter proporcionan-
do 544 mg del péptido treonil-valil-leucina libre (rendi-
miento 85%).

15

EJEMPLO 6

Preparación de N- α -acetil-O-benciltreonilvalil-leucinato
de bencilo.

20

Se prepara O-benciltreonilvalil-leucinato de
bencilo a partir de 1 g de clorhidrato de O-benciltreo-
nilvalil-leucinato de bencilo como en el Ejemplo 5 y se
disuelve en ácido acético, y se añaden 2 equivalentes de
anhídrido acético basado en el éster de bencilo. La mez-
25 cla se agita durante toda la noche. Los disolventes se
evacuan a vacío. El residuo se recristaliza en metanol/
éter, proporcionando 806 mg de N- α -acetil-O-benciltreo-
nilvalil-leucinato de bencilo (rendimiento 85%).

30

EJEMPLO 7Preparación de N- α -acetiltreonilvalil-leucinamida.

Se disuelve 1 g de N- α -acetil-O-benciltreonilvalil-leucinato de bencilo en etanol del 95%. Se burbujea amoníaco a través de la solución durante 8 horas. Después de agitar a la temperatura ambiente durante 48 horas, los disolventes se separan a vacío. El residuo se lava con éter proporcionando 795 mg (99%) de N- α -acetil-O-benciltreonilvalil-leucinamida. Un gramo de la N- α -acetil-O-benciltreonilvalil-leucinamida se somete a hidrogenolisis en etanol absoluto proporcionando 705 mg (rendimiento 90%) de N- α -acetiltreonilvalil-leucinamida.

EJEMPLO 8Síntesis de Merrifield de treonil-valil-leucina.

Se prepara una solución de 5,3 gramos de t-butiloxycarbonil-L-leucina (21,2 milimoles), 2,5 ml de trietilamina (18 milimoles) en el disolvente 2-metiltetrahidrofurano y se le añaden 20 gramos de resina de Merrifield, que es poliestireno reticulado con divinilbenceno al 2%, proporcionando 21,2 milimoles de cloro. La resina de Merrifield se analiza conteniendo aproximadamente 1,06 milimoles de cloro por gramo de resina, y antes de emplearse, la resina se lava con metanol, con agua destilada, con etanol y con cloruro de metileno y luego se seca

1 a vacío a 100°C. Antes del empleo del 2-metiltetrahydro-
furan se destila sobre una dispersión de sodio, y la
trietilamina se destila sobre isocianato de fenilo y lue-
go se vuelve a destilar sobre una dispersión de sodio.
5 La mezcla se lleva a reflujo durante aproximadamente 70
horas para efectuar la esterificación de los aminoácidos
bloqueados a la resina. Después de la reacción de este-
rificación, la resina se lava con tetrahydrofuran, eta-
nol, ácido acético glacial, etanol, agua destilada, eta-
10 nol y cloruro de metileno y luego se seca a vacío a 100°C
durante tres horas. Se obtienen aproximadamente 21,5-22
gramos del éster resínico de t-butiloxicarbonil-L-leuci-
na.

15 El éster resínico de la t-butiloxicarbonil-L-
-leucina se pone en suspensión en 200 ml de cloruro de
metileno y se agita burbujeando nitrógeno muy puro a tra-
vés de la suspensión. El grupo t-butiloxicarbonilo pro-
tector se separa añadiendo 400 ml de una mezcla de igual
volumen de ácido trifluoroacético y cloruro de metileno.
20 La resina se lava y luego se neutraliza empleando 400 ml
de trietilamina en cloroformo al 10% en volumen. La re-
sina se lava con cloro y cloruro de metileno. Se añaden
aproximadamente 4,82 gramos de t-butiloxicarbonil-L-vali-
na a la resina seguido de una cantidad equivalente, es
25 decir aproximadamente 4,57 gramos, de dicitohexilcarbo-
diimida (24 milimoles), y la reacción de copulación se
deja que transcurra durante al menos 16 horas. El éster
resínico de t-butiloxicarbonil-L-valil-L-leucilo resul-
tante se lava luego con cloruro de metileno, metanol esen-
30 cialmente anhidro, ácido acético glacial, etanol y cloruro

1 de metileno para eliminar la dicitclohexilurea como sub-
producto. El final de la reacción se comprueba por una
reacción de color de Kaiser.

5 Se emplea esencialmente el mismo procedimiento
que se ha descrito antes para eliminar el grupo t-butilo-
xicarbonilo (boc) protector. Al éster resínico sin blo-
quear se añaden 5,00 gramos de t-boc-O-bencil-L-treonina
y a continuación se añade una cantidad equivalente (es
10 decir 3,6 gramos) de dicitclohexilcarbodiimida (18,4 mili-
moles), y la reacción de copulación se deja que prosiga
durante cuatro horas. El éster resínico resultante se
lava esencialmente de la misma forma que se ha descrito
antes y luego se seca toda la noche a temperatura ambien-
te a vacío sobre pentóxido de fósforo. Se obtienen apro-
15 ximadamente 22-23 gramos de éster resínico de t-butiloxi-
carbonil-O-bencil-L-treonil-L-valil-L-leucilo.

La escisión del tripéptido de la resina se efec-
túa poniendo en suspensión el éster resínico de t-butilo-
xicarbonil-O-bencil-treonil-valil-leucina seco en 100 ml
20 de ácido trifluoroacético al 100% a través de la cual se
burbujea bromuro de hidrógeno anhidro. Durante este pro-
cedimiento se rompe la unión del éster resínico y simul-
táneamente el grupo O-bencilo protector a la treonina,
proporcionando las sales bromhidrato y trifluoro acetato
25 de treonil-valil-leucina solubles en ácido trifluoroacé-
tico.

La solución de ácido trifluoroacético se eva-
pora entonces hasta sequedad, y el residuo se disuelve
en 100 ml de una mezcla de igual volumen de metanol-agua
30 destilada. La mezcla se lleva hasta sequedad a presión

150147000

1 reducida, y el residuo se disuelve en 100 ml de etanol y
de nuevo se recupera secándolo a presión reducida. El ma-
terial seco se disuelve luego en 10 a 20 ml de una canti-
dad mínima de ácido acético glacial al 30% y se filtra.
5 Se añade lentamente carbonato de sodio o bicarbonato de
sodio sólido hasta que ocurre una precipitación. El pro-
ducto tripeptídico final se recrystaliza en etanol/agua
o disolviendo el producto en un gran exceso de agua des-
tilada, concentrando la solución por destilación de algo
10 de agua y dejando que ocurra la formación de cristales
a la temperatura del refrigerador, aproximadamente 5°C.
Se obtienen aproximadamente 657 mg de L-treonil-L-valil-
-L-leucina (rendimiento 75%) que tiene un intervalo de
punto de fusión de 240-242°C (con descomposición).

15

EJEMPLO 9

Preparación de L-treonil-L-valil-D-leucina

20

Se repite esencialmente el procedimiento del
Ejemplo 8 excepto que se emplea D-leucina en lugar de
L-leucina y se prepara L-treonil-L-valil-D-leucina. El
producto es una mezcla cristalina blanca que se observa
que tiene un punto de descomposición de aproximadamente
25 240°C con carbonización.

25

EJEMPLO 10

Preparación de N- α -acetil-treonilvalil-leucina.

30

31037

1 Se prepara éster resínico de t-butiloxicarbonil-
-O-benciltreonil-valil-leucina esencialmente de la misma
forma que se ha descrito en el Ejemplo 8. El grupo pro-
5 tector de t-butiloxicarbonilo se separa esencialmente de
la misma forma que se separan los grupos en el éster resi-
nico de leucilo y en el éster resínico de valil-leucilo
en el Ejemplo 8, proporcionando el éster resínico de O-ben-
ciltreonilvalil-leucina. Se acetilan aproximadamente 5,0
10 gramos de éster resínico de O-benciltreonilvalil-leucina
anhidro lavando primero el éster resínico con dimetilfor-
mamida, y haciendo reaccionar luego la resina con el re-
activo de acetilación que comprende 100 ml de 44 partes
en volumen de dimetilformamida, 5 partes en volumen de
anhídrido acético y 1 parte en volumen de trietilamina
15 durante 20-50 minutos y la resina se lava con dimetilfor-
mamida, seguida por cloruro de metileno, y luego se seca
bajo vacío a temperatura ambiente durante una noche.

El N-acetil-péptido se escinde de la resina
esencialmente de la misma forma que se ha descrito en el
20 Ejemplo 8. La solución de ácido trifluoroacético se eva-
pora luego hasta sequedad a presión reducida. El residuo
se lava con una mezcla de igual volumen de metanol y agua,
se recupera evaporando hasta sequedad y a presión reduci-
da, se lava con etanol y se recupera de nuevo evaporando
25 hasta sequedad a presión reducida. El producto final se
recristaliza luego en etanol-éter, proporcionando 400 mg
de N- α -acetil-treonilvalil-leucina (rendimiento del 55%),
que tiene un intervalo de punto de fusión de 210-214°C
(con descomposición).

30

EJEMPLO 11Síntesis de Merrifield de la sal clorhidrato de glicil-treonilvalil-leucina

Comenzando con 10 gramos de éster resínico de O-benciltreonilvalil-leucina preparado esencialmente de la misma forma que se ha descrito en el Ejemplo 10, se realiza la copulación de t-butiloxicarbonilglicina poniendo en suspensión el éster resínico en 100 ml de cloruro de metileno, añadiendo 1,94 gramos de t-butiloxicarbonilglicina (10 milimoles), seguido por una cantidad equimolecular, es decir, 2,06 gramos, de dicitclohexilcarbodiimida (10 milimoles) y dejando que prosiga la reacción de condensación durante 4 horas. El éster resínico de t-butiloxicarbonilglicil-O-bencil-treonil-valil-leucina se escinde de la resina esencialmente de la misma forma que se ha descrito en el Ejemplo 8. Después de los lavados apropiados con metanol, agua destilada, etanol y adición de carbonato de sodio para alcanzar un pH de 4,5, el producto se lleva hasta sequedad a presión reducida.

El producto de gliciltreonilvalil-leucina se convierte en su sal clorhidrato disolviéndolo en 100 ml de una mezcla de 3 partes en volumen de etanol por una parte en volumen de éter y burbujeando cloruro de hidrógeno gaseoso anhidro a través de la solución durante aproximadamente 10 minutos. El producto se filtra y seca durante la noche a temperatura ambiente en un desecador a vacío proporcionando 600 mg de la sal clorhidrato de gliciltreonilvalil-leucina (rendimiento 60%) que tiene un in-

1 tervalo de punto de fusión de 225-226°C (con descomposición).

5 EJEMPLO 12

Síntesis de Merrifield de N- α -acetil-treonilvalil-leucina

10 El éster resínico de O-bencil-treonilvalil-leucina (preparado esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 10) en una cantidad de 7,4 gramos se añade a un matraz de reacción y se pone en suspensión en 75 ml de cloruro de metileno. A la suspensión se le añaden luego 15 3,735 gramos de t-butiloxycarbonil-O-benciltirosina (10 milimoles), seguido por una cantidad equivalente de díciclohexilcarbodiimida (2,06 gramos, 10 milimoles) y se deja que prosiga la reacción de copulación durante cuatro horas. Se realiza una agitación burbujeando nitrógeno de elevada pureza a través de la suspensión. La resina se 20 lava luego con cloruro de metileno, etanol, ácido acético, etanol y cloruro de metileno para separar la díciclohexilurea como subproducto, y a continuación se seca toda una noche a temperatura ambiente a vacío sobre pentóxido de fósforo. El producto seco, el éster resínico de O-ben- 25 ciltirosil-O-benciltreonilvalil-leucina, aumenta típicamente en peso a 7,50-7,55 gramos.

La acetilación en N se lleva a cabo esencialmente por el procedimiento descrito en el Ejemplo 10 para la síntesis de N- α -acetil-treonilvalil-leucina excepto 30 que se emplean 7,5 ml de anhídrido acético, 2,5 ml de

1 trietilamina y 50 ml de dimetilformamida. Después de la
acetilación en N, la resina se lava con dimetilformamida,
seguida con cloruro de metileno y se seca bajo vacío a
temperatura ambiente durante una noche.

5 La escisión del péptido de la resina de Merrifield se realiza esencialmente de la misma forma que se
ha descrito en el Ejemplo 8 excepto que para evitar posi-
bles sustituciones aromáticas electrófilas en el anillo
de tirosina por bromo, el bromuro de hidrógeno se hace
10 pasar primero a través de una mezcla de resorcina-ácido
trifluoroacético en una relación de 2 gramos de resorci-
na por 100 ml de ácido trifluoroacético para separar las
trazas de Br₂. Como precaución adicional frente a la sus-
titución electrófila, se añaden 20 ml de anisol directa-
15 mente al recipiente de escisión. El producto final, N- α -
-acetil-tirosiltreonilvalil-leucina, se recristaliza en
etanol-éter proporcionando 900 mg del tetrapéptido (rendi-
miento 59%) que tiene un intervalo de punto de fusión de
234,5 - 235°C (con descomposición). El análisis de amino-
20 ácidos del producto proporciona 0,93 de tirosina, 1,00 de
treonina, 1,00 de valina y 1,00 de leucina.

EJEMPLO 13

25 Síntesis de Merrifield de treonilvalil-lisoleucina.

Se prepara una solución de 5,3 g de t-butoxicar-
bonil-L-isoleucina (21,2 milimoles), 2,5 ml de trietilami-
na (18 milimoles) en el disolvente 2-metiltetrahidrofura-
30 no y se le añaden 20 gramos de resina de Merrifield. An-

1 tes de emplearla, la resina se lava con metanol, agua des-
tilada, etanol y cloruro de metileno y se seca a vacío
a 100°C. Antes del empleo, el 2-metiltetrahydrofurano se
5 destila sobre una dispersión de sodio, y la trietilamina
se destila sobre isocianato de fenilo y luego se vuelve
a destilar sobre una dispersión de sodio. La mezcla se
lleva a reflujo durante aproximadamente 72 horas para
efectuar la esterificación de los aminoácidos bloqueados
a la resina. Después de la reacción de esterificación,
10 la resina se lava con tetrahydrofurano, etanol, ácido acé-
tico glacial, etanol, agua, destilada, etanol y cloruro
de metileno y a continuación se seca a vacío a 100°C du-
rante tres horas. Se obtienen aproximadamente 21,5-22
gramos de éster resínico de t-butiloxycarbonil-L-isoleu-
15 cina. Esta copulación de la t-butiloxycarbonilvalina al
éster resínico de t-butiloxycarbonilisoleucina se reali-
za esencialmente de la misma forma que la copulación de
t-butiloxycarbonil-L-valina al éster resínico de t-butil-
oxycarbonil-L-isoleucina descrito en el Ejemplo 8. Sin
20 embargo, debido incluso al mayor impedimento estérico,
la reacción se deja que continúe durante 24 horas. La
resina se lava a continuación como es usual para elimi-
nar los sub-productos y el final de la reacción se com-
prueba por la reacción de color de Kaiser. La adición
25 a t-butiloxycarbonil-treonina para obtener el éster re-
sínico de t-butiloxycarbonil-treonilvalil-isoleucina, la
escisión del péptido desde la resina para obtener t-butil-
oxycarbonil-treonilvalil-isoleucina, y su aislamiento y
purificación subsiguientes, se realizan esencialmente de
30 la misma forma que en la preparación de treonilvalil-leu-

1 cina descrita en el Ejemplo 8. El tripéptido, treonilvalilileucina, se obtiene en una cantidad de aproximadamente 600 mg (rendimiento 68%).

5

EJEMPLO 14.

Síntesis de Merrifield de treonil-valil-leucinil-arginina

10 Se sigue esencialmente el mismo procedimiento que en el Ejemplo 8 excepto que se emplean 6,78 gramos de t-butiloxicarbonilnitro(guanidinil)-L-arginina (21,2 milimoles) como aminoácido esterificado a 20 gramos de la resina de Merrifield. La esterificación se realiza llevando a reflujo la mezcla durante aproximadamente 72 ho-
15 ras y el éster resínico se lava y seca como en el Ejemplo 8 proporcionando aproximadamente 22 ó 23 gramos del éster resínico de t-butiloxicarbonil-nitroarginina. Se copulan aproximadamente 5 gramos de t-butiloxicarbonil-L-leucina (24 milimoles) al éster resínico de nitroarginina por
20 adición de una cantidad equivalente de dicitclohexilcarbodiimida (4,6 gramos, 24 milimoles), dejando que la reacción prosiga durante 16 horas. Después que se lava el éster resínico, la copulación de t-butiloxicarbonil-L-valina y t-butiloxicarbonil-O-bencil-L-treonina al éster resínico se realiza esencialmente por el mismo procedimiento que se ha descrito previamente en el Ejemplo 8. Se obtienen aproximadamente 24 gramos del éster resínico de t-butiloxicarbonil-O-benzoil-L-treonil-L-valil-L-leucil-arginina.

30

Debido a la estabilidad del grupo nitro al bro-

1 muro de hidrógeno, el éster resínico de péptido protegido
se escinde con fluoruro de hidrógeno anhidro con el fin
de efectuar también la separación del grupo nitro. Des-
5 pués del paso a través de una resina de intercambio ióni-
co apropiada, el eluyente se concentra hasta un aceite y
luego se precipita isoelectricamente por adición de car-
bonato de sodio sólido. El producto, L-treonil-L-valil-
-L-leucil-L-arginina, se recristaliza en una solución de
10 etanol-agua proporcionando aproximadamente 900 mg de te-
trapéptido.

Los péptidos que tienen la estructura T-V-L ca-
racterística pueden también prepararse empleando una re-
acción en fase sólida con resina clorometilada que es un
poliestireno reticulado con resina de divinilbenceno y es-
15 tá comercialmente disponible de Bio Rad Laboratories,
Richmond California, con la marca registrada Bio Beads
SX-1. En estos procedimientos para la adición de restos
peptídicos, por ejemplo, un éster resínico de t-butiloxi-
carbonil-leucina se pone en suspensión en dioxano y se
20 desbloquea empleando ácido clorhídrico 4 normal. El clor-
hidrato resultante se neutraliza con trietilamina y se la-
va. La copulación de los restos aminoácidos adicionales
puede realizarse empleando un agente de copulación tal
como dicitclohexilcarbodiimida. Este procedimiento no se
25 ha encontrado que fuera económicamente atractivo como
otros procedimientos de síntesis, por ejemplo, la sínte-
sis de Merrifield.

30

310 37

EJEMPLO 15Ester metílico de treonil-valil-leucina.

Se coloca treonilvalil-leucina bruta (0,066 g, 0,2 milimoles) en un vial de reacción de 5 ml y se seca a 100°C bajo vacío durante una noche sobre un desecador de anhídrido fosfórico. El tripéptido seco se disuelve en 0,54 ml de metanol anhidro. Se añade una mezcla previamente preparada de dimetoxipropano y cloruro de hidrógeno de calidad de reactivo en una relación en peso de 542:83 en una cantidad de 0,63 ml a la mezcla de reacción. El vial de reacción se cierra herméticamente. La mezcla se remueve exhaustivamente y a continuación se deja reposar durante la noche proporcionando el éster metílico de treonilvalil-leucina. Los disolventes se separan a continuación por evaporación bajo una corriente de nitrógeno, seguido por secado al vacío del éster a 100°C sobre un desecador de anhídrido fosfórico durante una noche.

EJEMPLO 16Ester metílico de N-O-diacetil-treonilvalil-leucina.

Se disuelve el producto del Ejemplo 15 en 0,38 ml de piridina. Se añade anhídrido acético en la cantidad de 0,1 ml (2 milimoles) como agente de acilación y la mezcla de reacción se mantiene a 37°C durante 20 minutos en un vial cerrado herméticamente. El disolvente se separa del producto acilado por evaporación bajo una co-

1 corriente de nitrógeno anhidro, seguido por secado a vacío
a 100°C sobre un desecador de anhídrido fosfórico durante
una noche.

5 El éster tripeptídico acilado, éster metílico
de N-O-diacetil-treonil-valil-leucina, puede purificarse
disolviendo el producto bruto en metanol y haciendo pasar
la muestra por una operación de cromatografía líquida a
presión elevada. Un cromatógrafo líquido modular Waters
10 equipado con una columna preparativa de 3 metros por 9,5
mm de diámetro rellena con Phenylporasil-B[®] se emplea
utilizando metanol como eluyente. La elución se controla
por cambios en el índice de refracción y en la absorban-
cia UV a 225 nm, el caudal del metanol eluyente es 1 ml
por minuto. El pico principal con un volumen de reten-
15 ción de aproximadamente 100 ml se recoge como la fracción
purificada. El disolvente de esta fracción se separa por
evaporación bajo una corriente de nitrógeno anhidro se-
guido por secado a vacío a 100°C en un desecador de anhí-
drido fosfórico durante una noche.

20 El ejemplo siguiente ilustra el aislamiento y
producción del tripéptido treonilvalil-leucina de fuen-
tes animales.

EJEMPLO 17

25 Extracción y aislamiento de polipéptido que contiene treonil-valil-leucina a partir del cerebro de bueyes.

30 Los hipotálamos de varios cerebros de bueyes
se disecan y homogeneizan en una solución tampón, citada

1 más adelante, como "tampón de citrato tris", que ha sido
preparado como sigue:

Tampón de citrato tris

5 Una solución acuosa 0,498 molar de tampón de ci-
trato tris se prepara como sigue. A 1 litro de
agua destilada se añaden 9,58 gramos del ácido
citríco y 49,9 gramos de tris(hidroximetil)-ami-
nometano. El pH de la solución resultante se
10 ajusta a 8,65 por adición de una solución acuo-
sa 0,1 molar de hidróxido de sodio.

La homogeneización de los hipotálamos se reali-
za en cuatro partes en volumen (mililitros) del tampón
de citrato tris por cada parte en peso (gramos) de hipo-
15 tálamos. La mezcla homogeneizada se centrifuga a 15.000
rpm durante 20 minutos a 4°C y se retiene el líquido so-
brenadante, que contiene factor de anti-S-proteína ex-
traído junto con numerosas impurezas.

20 Cuatro kilogramos de hidrolizado de almidón se
lavan una vez con agua destilada, a continuación dos ve-
ces con el tampón de citrato tris. Al almidón húmedo se
le da forma de un bloque que mide 123 cm de largo por 60
cm de ancho y por 5 cm de grueso. Los dos extremos del
bloque se mantienen en su lugar por papel de filtro para
25 permitir que el tampón en exceso salga por drenado del
bloque. Después de dicho drenaje el bloque tiene un es-
pesor de sólo aproximadamente 1,5 cm.

A través del ancho del bloque de almidón, co-
menzando en un punto a 43,5 cm de uno de sus extremos,
30 se escava una sección de 2,5 cm de ancho del bloque. La

1 temperatura del bloque se ajusta a 4°C. El líquido sobre-
nadante que contiene el factor de anti-S-proteína de la
centrifugación anterior (que mide aproximadamente 35-40
5 ml) se mezcla con 10 gotas de azul de bromofenol. La so-
lución resultante se mezcla con el almidón escavado y esa
mezcla se vierte en el hueco de 2,5 cm de ancho en el blo-
que.

10 El bloque se somete luego a una corriente elec-
troforética de 750 voltios y 50 miliamperios, conectándo-
se el cátodo al extremo del bloque que está a 43,5 cm dis-
tante del hueco, y el ánodo al otro extremo. La corrien-
te se hace pasar continuamente por el bloque hasta que
la línea azul a través de lo ancho del bloque (proporcio-
nada por la presencia del azul de bromofenol) se mueve
15 hacia el ánodo una distancia de 42 cm. Esto requiere
aproximadamente 18 horas. Durante este tiempo una línea
roja brillante (proporcionada por la hemoglobina que es-
taba presente en el extracto de los hipotálamos se mueve
hacia el cátodo a una distancia de aproximadamente 5 cm
20 del hueco.

La zona entre las líneas azul y roja después
que se completa la electroforesis se divide en 10 tiras,
extendiéndose cada tira a todo lo ancho del bloque y
siendo de aproximadamente 5 cm de ancha. Cada tira se
25 separa y excava completamente del bloque y se pone en
suspensión en 12 ml del tampón de citrato tris durante
aproximadamente 10 minutos. La suspensión se filtra lue-
go a vacío a través de un embudo Buchner. Cada una de
las 10 fracciones resultantes se analiza de acuerdo con
30 el método de absorción de triptófano descrito en Biolo-

1 gical Psychiatry, Vol. 7 Nº 1, p 53, (1973) como una in-
dicación de la cantidad de factor de anti-S-proteína en
ellas. Se retienen dos o tres de las fracciones activas.
Numerando las tiras en el bloque de almidón del 1 al 10
5 comenzando con la que está junto a la línea azul, las
fracciones que contienen la mayor actividad de factor de
anti-S-proteína son generalmente las obtenidas de las
tiras Números 2, 9 y 10.

10 El procedimiento anterior se repite un número
de veces suficiente para proporcionar 20 fracciones que
tienen una actividad relativamente elevada de factor de
anti-S-proteína. Estas 20 fracciones se reúnen luego y
se someten a evaporación a través de un tubo de diálisis
para reducir el volumen desde 100-160 ml iniciales a apro-
15 ximadamente 40-60 ml.

Se prepara una columna rellena para emplear en
cromatografiar la solución concentrada del factor de an-
ti-S-proteína bruto como sigue:

Columna de celulosa DEAE

20 Se lavan 800 gramos de celulosa del tipo DEAE
marca "Selectacel" (una dietilaminoetilcelulosa vendida
por Brown Company of Berlin, New Hampshire) dos veces con
porciones de 19 litros de una solución acuosa 0,19 normal
de hidróxido de sodio. A continuación el material relleno
25 no se lava con porciones de 19 litros de ácido clorhídrico
0,19 normal. El material se lava luego con un tampón de
fosfato 0,005 molar hasta que quede libre de cloruro (ge-
neralmente 25 lavados). El material de relleno se colo-
ca luego en una columna de vidrio de 110 cm de altura
30 que tiene un diámetro interno de 2,5 centímetros.

1 La solución bruta concentrada de factor de anti-
-S-proteína se coloca en la columna de DEAE y la columna
se eluye luego empleando un sistema de elución con gra-
diente de dos matraces, en el que el matraz A contiene
5 1000 ml de una solución acuosa de un tampón de fosfato
catiónico 0,005 molar (pH 7,4) y el matraz B contiene
1000 ml de una solución acuosa de un tampón de fosfato
catiónico 0,04 molar (pH 4,3) que se ha aumentado con clo-
ruro de sodio en una relación de 405,5 gramos de cloruro
10 de sodio por 50 litros de solución tampón. El eluato se
recoge en fracciones de 15 ml, se numeran aproximadamen-
te 120 en total. Cada fracción se analiza en cuanto la
actividad del factor de anti-S-proteína por el método de
absorción de triptófano y las 10 fracciones que tienen la
15 mayor actividad del factor anti-S se reúnen y concentran
por liofilización hasta aproximadamente 10% de su volumen
original.

El procedimiento anterior completo se repite un
número suficiente de veces para proporcionar suficiente
20 concentrado que contiene factor de anti-S-proteína mos-
trando un contenido de proteína total de aproximadamente
200 miligramos cuando se determina por el método de Low-
ry. Esto requerirá aproximadamente 300-400 ml de concen-
trado, que a su vez requerirá aproximadamente 400-1000
25 gramos de hipotálamo de buey, que a su vez requerirá
aproximadamente 160 cabezas de ganado.

El concentrado que contiene aproximadamente
200 mg de proteína se realiza contra agua destilada du-
30 rante 24 horas. Por cada 17 ml del concentrado, se añe-

1 den 4,25 ml de tripsina 0,1 molar y 2,1 ml de CaCl_2 1 mo-
lar. El pH de la mezcla completa se ajusta 7,8 con NaOH
1 molar y a continuación se incuba durante 2 horas en un
5 agitador con baño de agua a 37°C . Después de la incuba-
ción, la solución se filtra a través de una membrana Dia-
flo de peso molecular 10.000 (Amicon UM-10). Después de
filtración, se añaden 4,25 ml de una solución de pepsina
0,1 molar por 17 ml de la mezcla filtrada. El pH se ajust-
ta a 1,5 con HCl 1 molar y la mezcla se incuba de nuevo
10 durante 2 horas a 37°C . Después de la incubación, el pH
se aumenta a 7,8 con NaOH 1 molar y la solución se filtra
a través de una membrana Diaflo de peso molecular 1000
(Amicon UM-2).

El filtrado se somete a evaporación súbita para
15 reducir su volumen a aproximadamente 50 ml. La mezcla re-
sultante se centrifuga y se retiene el líquido sobrena-
dante. El pH del líquido sobrenadante se ajusta a menos
de 2,2 por adición de ácido clorhídrico concentrado. El
líquido acidificado se diluye luego con agua destilada
20 hasta un volumen de 75 ml. Esta solución que contiene
el factor de anti-S-proteína se somete luego a cromato-
grafía de columna en una columna preparada como sigue:

Primera columna de resina sulfonada

25 El material de relleno empleado es la marca
"Aminex 50-WX2" de Bio Rad Company, que es una resina de
intercambio catiónico "Dowex" en forma de ion hidrógeno
que tiene un tamaño de partícula de 200-325 mallas. La
resina es un poliestireno sulfonado que tiene 2% nominal
30 de reticulación por divinilbenceno. El material de re-

1 lleno se lava en un embudo Buschner con ácido clorhídrico
0,1 normal hasta que el lavado es incoloro. A continua-
ción el material se lava con agua destilada hasta que el
5 agua de lavado presente un pH de 5, después de lo cual el
material se lava con aproximadamente tres volúmenes de
solución acuosa 2,0 normal de hidróxido de sodio. De nue-
vo el material se lava con agua destilada hasta que el
agua de lavado tiene un pH de 5. El material de relleno
se transfiere luego a un vaso y se pone en suspensión en
10 dos volúmenes de una solución acuosa 1 normal de hidróxi-
do de sodio a 35°C durante 2-3 horas. La suspensión re-
sultante se filtra luego por un embudo Buchner y la tor-
ta de filtro se lava con agua destilada hasta que el agua
de lavado tiene un pH de 5. El material de relleno se
15 pone luego en suspensión en dos volúmenes de una solución
acuosa 0,2 molar de citrato de sodio (pH 3,1) y la sus-
pensión se vierte en una columna de vidrio de 150 cm de
altura y 2 cm de diámetro interno.

La solución acuosa y ácida del factor de anti-
20 -S-proteína bruto se coloca en la columna de Aminex y la
columna se eluye luego empleando un sistema de elución
con gradiente de dos matraces, en el que el matraz A con-
tiene 2000 ml de solución acuosa 0,2 molar de citrato de
sodio (pH 3,1) y el matraz B contiene 2000 ml de un tam-
25 pón de acetato-citrato (pH 9,1) preparado a partir de
315 gramos de ácido cítrico y 402 gramos de acetato de
sodio en 4 litros de agua desionizada. La columna se man-
tiene bajo $0,7 \text{ kg/cm}^2$ de nitrógeno. El eluato se recoge
en fracciones de 10 ml, numerando aproximadamente 120 en
30 total.

1 Las fracciones se numeran en el orden en el que
salen de la columna. Cada una de las fracciones así ob-
tenidas se analiza por el método de absorción de triptó-
fano en cuanto a la actividad del factor de anti-S-protei-
5 na. Se prepara un gráfico representando los números de
la fracción a lo largo del eje X y las actividades de las
fracciones a lo largo del eje Y. Al menos se observará
un máximo de actividad en el gráfico resultante, general-
mente en la región entre la fracción vigésima y la frac-
10 ción trigésima, y se observarán a menudo otros máximos,
por ejemplo, uno en la fracción 40, otro en la 70, otro
en la 90 y otro en la región entre 110 y 120. Las frac-
ciones que producen cada máximo, por ejemplo, aproxima-
damente 2 ó 3 fracciones de las 20 primeras, se reúnen para
15 un tratamiento adicional. Cada masa resultante se trata
a continuación separadamente de la forma siguiente.

CROMATOGRAFIA DE PARTICION

METODO A

20 La masa reunida de fracciones que presentan ac-
tividad elevada del factor de anti-S-proteína se evapora
bruscamente en un evaporador rotatorio a aproximadamente
25 5-10 ml. El concentrado resultante se somete luego a
electroforesis de cortina empleando un aparato de elec-
troforesis de cortina Beckman Spinco modelo CP. Se pre-
paran 20 litros de una solución de electrolito mezclando
22,4 ml de una solución acuosa 0,5 molar de KH_2PO_4 con
30 259,2 ml de una solución acuosa 0,5 molar de Na_2HPO_4 , di-

1 luyendo la mezcla a 20 litros con agua destilada, y ajustando el pH de la solución resultante a 8,0 por adición
bien de ácido fosfórico o bien de hidróxido de sodio, según se requiera. Se emplea una corriente continua de 50
5 miliamperios y 950 voltios. Solo se emplean aproximadamente 5 litros de la solución de electrolito para cada serie. La solución electroforéticamente fraccionada del factor de anti-S-proteína más impurezas se recoge del aparato de electroforesis en 32 fracciones, teniendo cada una
10 un volumen de aproximadamente 15 ml. Cada una de estas fracciones se analiza en cuanto a la actividad del factor de anti-S-proteína por el método de absorción con triptófano. Las fracciones que tienen la mayor actividad se retienen y reúnen. Estas son a menudo las fracciones 8ª a
15 12ª tomadas del aparato.

La masa reunida de las fracciones más activas se somete a una evaporación brusca en un evaporador rotatorio para reducir su volumen a aproximadamente 1-5 ml. La solución concentrada, que contiene ahora tampoco como
20 aproximadamente 5 mg de material polipeptídico, se somete luego a separación empleando columnas de un tamiz molecular preparado como sigue.

Columnas de tamiz molecular

25 Dos columnas de vidrio se emplean en serie, teniendo cada una 200 cm de altura y 0,81 cm de diámetro interno. Ambas columnas se rellenan con material de tamiz molecular de marca "Sephadex G-15 fine" suministrado por Pharmacia Fine
30

1 Chemicals de Piscataway, New Jersey. Este ma-
terial es un dextrano en partículas que tiene
una gama de tamaño de partícula de 40-120 mi-
cras.

5 La solución que contiene factor de anti-S-pro-
teína se hace pasar a través de dos columnas de "Sepha-
dex", empleando ácido acético 0,02 molar. El eluato se
recoge en fracciones de 2 ml, numerando aproximadamente
120 en total. Cada una de estas fracciones se analiza
10 por el método de absorción de triptófano en cuanto a ac-
tividad del factor de anti-S-proteína y se analiza tam-
bién en cuanto al contenido polipeptídico total por ab-
sorción UV, empleando una longitud de onda de 220 nanó-
metros. Suficientes fracciones de las más activas (en
15 términos de la actividad del factor de anti-S-proteína)
se reúnen proporcionando un contenido polipeptídico to-
tal en el intervalo de aproximadamente 60 microgramos a
1,5 mg. La solución resultante se somete luego a evapo-
ración brusca en un evaporador rotatorio para reducir
20 su volumen a aproximadamente 1-3 ml.

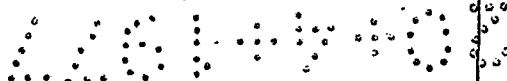
La solución concentrada del factor de anti-S-
-proteína más las impurezas se somete luego a cromato-
grafía de intercambio iónico empleando la columna siguien-
te:

25

Segunda columna de resina sulfonada

30

La columna de vidrio es de 200 cm de alto y
tiene un diámetro interno de 0,81 cm. El re-
lleno es la resina de intercambio catiónico



1 de marca "Aminex 50-WX2" descrita anteriormente
en la presente memoria. El relleno se coloca en
la columna y se equilibra con una solución tam-
pón de citrato de sodio 0,2 normal (pH 3,0) y
5 el sistema se lleva luego hasta una temperatura
de 35°C.

La solución que ha de cromatografiarse se colo-
ca en la columna y la columna se eluye luego empleando un
sistema de elución con gradiente de dos matraces, en el
10 que el matraz A contiene 1 litro de solución de tampón
de citrato de sodio 0,2 normal (pH 3,0) y el matraz B con-
tiene 250 ml de una solución tampón que ha sido preparada
como sigue: Se forma una solución de 14,6 gramos de áci-
do cítrico, 20,6 gramos de acetato de sodio, 3,1 ml de
15 ácido acético glacial y 800 ml de agua destilada; el pH
de la solución resultante se ajusta a 4,0 por adición de
ácido clorhídrico concentrado; y el volumen de la solu-
ción se lleva entonces hasta 1 litro por adición de agua
destilada.

20 El eluato de la columna se recoge en fracciones
de 5 ml a una velocidad de aproximadamente 4 a 5 fraccio-
nes por hora. Se recogen en total aproximadamente 130 a
150 de tales fracciones. Cada fracción se analiza en cuan-
to a la actividad del factor de anti-S-proteína por el
25 método de absorción de triptófano. La fracción o frac-
ciones que tienen la actividad mayor constituyen solucio-
nes del factor de anti-S-proteína que son relativamente
puras, es decir, están exentas de la mayoría de los otros
materiales peptídicos, materiales celulares, etc., que
30 acompañaban el factor cuando se extrajo del hipotálamo

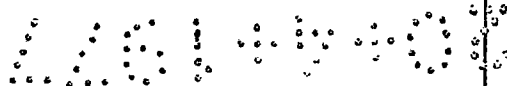
ANEXO

1 del buey en la solución de tampón de citrato tris. Las
fracciones que tienen las mayores concentraciones de fac-
tor de anti-S-proteína se encuentran a menudo en el inter-
valo de los números de fracciones 80 a 86. El análisis
5 de los aminoácidos de estas fracciones muestra que el fac-
tor es un polipéptido constituido por alguna combinación
de algunos de los aminoácidos siguientes: ácido glutámi-
co, treonina, valina, leucina, fenilalanina, tirosina,
ácido aspártico, serina y glicina. La evaluación estadís-
tica de los datos del análisis de aminoácidos, junto con
10 los estudios enzimáticos, indica que el factor de anti-S-
proteína contiene el tripéptido L-treonil-L-valil-L-leu-
cina.

15

METODO B

Alternativamente cada masa reunida del fraccio-
namiento antes descrito y el análisis por el método de ab-
sorción de triptófano puede tratarse separadamente y pu-
rificarse por cromatografía de partición de fase inverti-
da. Esta cromatografía de partición de fase invertida
se realiza empleando un programador de disolvente de Wa-
ters Associates modelo 660 y un sistema de suministro de
disolvente de Water Associates Modelo 6000 junto con una
20 columna B de fenil-porasil de 1,8 a 3 metros por 9,5 mm
obtenida de Waters Associates. La columna se aloja en un
compartimiento a temperatura constante hecho de bloques
de espuma de estireno que rodean un baño a temperatura
constante del tipo Haake FE. La introducción de las mues-
tras en la columna se efectúa por un inyector universal
30

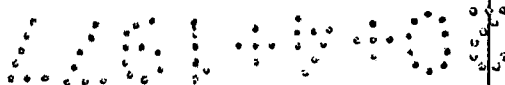


1 de Waters Associates Modelo U6K (1 microlitro al 10 ml)
y el efluente de la columna se recoge con un recolector
de fracciones de Scientific Manufacturing Industries
1205. El efluente de la columna se controla con un es-
5 pectrofotómetro ultravioleta Beckman modelo 25 equipado
con un conjunto de microcélula Lc-25 de Waters Associa-
tes y con un refractómetro diferencial de Waters Associa-
tes R-401.

10 Para cada masa reunida de la columna de resina
sulfonada, la fracción se seca y luego se disuelve en
5-10 ml de disolvente y se inyecta en la columna. La elu-
ción de la columna se controla por índice de refracción
así como por absorbancia a 225 nanómetros. Cuando se elu-
yen los máximos o picos, el flujo de la columna se detie-
15 ne y se examina la muestra por absorbancia de UV de 350
a 210 nanómetros. Las fracciones de 5 ml cada una se re-
cogen y se reúnen los máximos homogéneos. La fracción,
o reuniones, se llevan hasta sequedad y se someten a aná-
lisis de aminoácidos y análisis de absorción de triptó-
20 fano para determinar los máximos que tienen la actividad
de inhibición.

La fracción que contiene la L-treonil-L-valil-
-L-leucina puede acilarse en N y/o esterificarse sustan-
cialmente de acuerdo con los mismos procedimientos reco-
25 gidos en los Ejemplos 10, 15 y 16.

Como se ha indicado antes, la investigación
referente a la esquizofrenia ha conducido al aislamiento
de una α -2-globulina (S-proteína alfa-helicoidal) a par-
tir del plasma de los pacientes esquizofrénicos que tie-
30 ne actividades diferentes que la α -2-globulina similar



1 (S-proteína al azar) obtenida del plasma de los individuos
normales. Véase Frohman, et al, Recent Advances in Biolo-
2 gical Psychiatry, supra. La S-proteína alfa-helicoidal
aislada de los pacientes esquizofrénicos, cuando por ejem-
5 plo se administra a ratas proporciona respuestas psicoló-
gicas observables en las ratas. Caldwell, et al, en Bio-
logical Psychiatry, supra, indica que la administración
de la S-proteína alfa-helicoidal a ratas reduce la auto-
-estimulación de placer de las ratas. Empleando los pro-
10 cedimientos establecidos por Caldwell y otros, se evalúan
varios péptidos de este invento para determinar su capa-
cidad para invertir el efecto de la S-proteína alfa-heli-
coidal. De esta forma se ilustra la actividad de los com-
ponentes de este invento para aliviar los síntomas de la
15 esquizofrenia en los seres humanos. Se ha encontrado tam-
bién que los péptidos que contrarrestan la actividad de
la S-proteína alfa-helicoidal presentan inhibición de la
absorción de triptófano, y, como se observa en el Ejemplo
17, el análisis de absorción de triptófano puede emplear-
20 se para ayudar a aislar las fracciones peptídicas que son
activas frente a la S-proteína alfa-helicoidal.

EJEMPLO 18

25 Se repite esencialmente el procedimiento para
autoestimulación intracraneal en ratas descrito en las
páginas 237 a 239 de Caldwell et al, Biological Psychia-
try, supra, (incorporada en la presente memoria como an-
terioridad en su totalidad), excepto lo que se indica a
30 continuación. Las ratas que tienen los electrodos para

.. . . .

1 estimulación colocados en el haz del cerebro anterior me-
 5 diano se ensayan para determinar el número de presiones
 a la barra que se espera de los animales en un período de
 tiempo dado. La S-proteína alfa-helicoidal se administra
 10 intercisternalmente, y el número de presiones a la barra
 se observa que desciende hasta aproximadamente 77% de la
 cantidad prevista. Varios polipéptidos se administran
 intramuscularmente a la rata en una cantidad de 0,2 mg/kg
 de peso corporal para determinar si los polipéptidos in-
 15 vierten el efecto de la S-proteína alfa-helicoidal. Tam-
 bién se realizan absorciones de triptófano para los poli-
 péptidos ensayados. La inhibición de la absorción de
 triptófano se determina en 10 minutos. Los resultados
 de los ensayos se recogen en la Tabla siguiente.

15	Péptido administrado	Inhibición de Restauración de la absorción la presión de de triptófa- la barra, % no, %
20	Treonil-valil-leucina	19,8 85
	N-acetil-treonilvalil-leu- cina	20,2 100
	Gliciltreonilvalil-leucina	24,3 100
25	Fenilalanilproliltreonil- valil-leucilprolil-fenil- alanina	39,5 100
	N-acetil-treonilvalil-leucina mida	56,5 100
30	Treonilvalil-leucinamida	21,6 90

LIBRARY

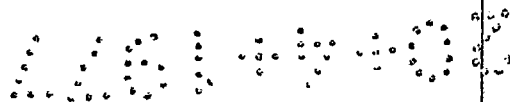
1	Péptido administrado	Inhibición de la absorción de triptófano, %	Restauración de la presión de la barra, %
5	Treonilvalilileucina	5,6	41

Los polipéptidos siguientes se ensayan en cuanto a la inhibición de la absorción de triptófano. La inhibición de la absorción de triptófano se determina en 10 minutos.

15	Péptido administrado	Inhibición de la absorción de triptófano, %
	Ester metílico de N- α -acetil-treonilvalil-leucina	24,2
	N- α -acetil-tirosiltreonilvalil-leucina	21,3
20	Prolil-treonilvalil-leucilprolil-glicina	44,2

Los polipéptidos siguientes se ensayan en cuanto a la inhibición de la absorción de triptófano a tiempos de 10, 15 y 30 minutos.

30	Péptido administrado	Inhibición de la absorción de triptofan, %
		Tiempo: 10 minutos 15 minutos 30 minutos



Péptido administrado	Inhibición de la absorción de triptofan, %		
	Tiempo:		
	10 minutos	15 minutos	30 minutos
D-alanil-L-treonil-L-valil-L-leucina	15	16	0
L-treonil-L-valil-D-leucina	12	18	21

Los datos siguientes ilustran el empleo de los restos aminoácidos que contienen la configuración D para inhibir la absorción de triptófano. Como se demuestra con la D-alanil-L-treonil-L-valil-L-leucina, después de un período de tiempo la inhibición de la absorción de triptófano puede disminuirse. Sin embargo, el polipéptido esencial que tiene la estructura T-V-L presentaba una duración mejorada de la actividad cuando el resto de leucina era de la configuración D.

Los polipéptidos siguientes se ensayan de modo similar pero con fines de comparación. La inhibición de la absorción de triptófano se determina a los 10 minutos.

Péptido administrado	Inhibición de la Restauración de absorción de triptófano, %	
	la presión sobre la barra, %	
Glicilglicilglicina	0	3
O-bencil-treonilvalil-leucinamida	0	tóxico
N- α -acetil-O-bencil-treo		

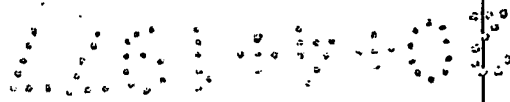
310.37

1	Péptido administrado	Inhibición de la absorción de trip tófano, %	Restauración de la presión sobre la barra, %
5	nil-valil-leucinamida Clorhidrato de bencil- -O-bencil-treonilvalil-	0	tóxico
	-leucato	0	tóxico
10	L-treonil-L-valil-L-leucil- -D-alanina	2	No ensayado

15 Como se ilustra con los datos anteriores respecto al ensayo de L-treonil-L-valil-L-leucil-D-alanina, la presencia del resto (L) de la estructura T-V-L esencial de un sustituyente que es relativamente difícil de hidrolizar a partir de una función carboxílica de un aminoácido, deja a los péptidos sin actividad significativa de absorción de triptófano.

20 Siguiendo esencialmente los mismos procedimientos que se han descrito antes, se ensayan N-acetil-tirosiltreonilvalil-leucina, proliltreonilvalil-leucilprolilglicina para determinar su efecto en las ratas a las que ha sido administrada la S-proteína alfa-helicoidal. Se encuentra que cada uno de estos materiales que contiene
25 polipéptidos restaura la actividad presora de la barra de las ratas. Otros polipéptidos que presentan actividad útil para aliviar los síntomas de la esquizofrenia incluyen treonilvalil-leucilarginina.

30



1

- REIVINDICACIONES -

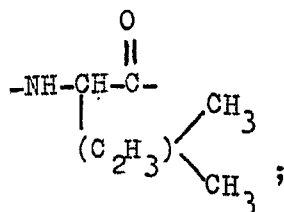
5

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:

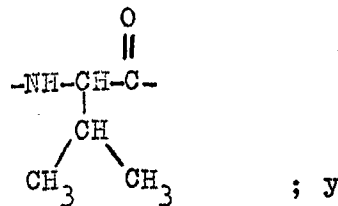
10

1ª.- Un método mejorado para preparar un polipéptido que comprende hacer reaccionar restos de aminoácidos de la estructura

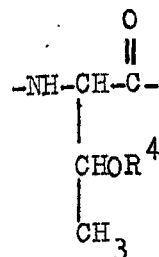
15



20



25

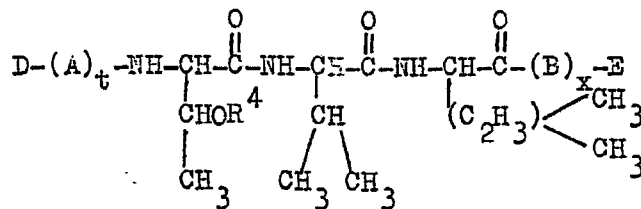


30

Handwritten mark

Microfilm perforations

1 en orden secuencial por reacción de la función amina de
 dicho resto de aminoácido con la función carboxilica de
 otro resto de aminoácido, en el que están bloqueados los
 sitios en los restos de aminoácidos que conducen a una
 5 reacción secundaria indeseable, proporcionando un compues-
 to polipeptídico de la fórmula



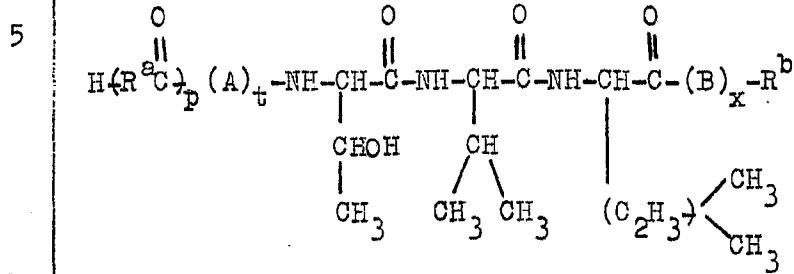
10 en la que A es un radical α -monoiminoacilo que contiene 2
 a aproximadamente 10 átomos de carbono; B es un radical
 α -monoiminoacilo hidrolizable que contiene 2 a aproxima-
 15 damente 10 átomos de carbono; D es -H, $\text{H(R}^a\text{C)}_p$, o un gru-
 po protector de α -amino en el que R^a es alcohileno de 1 a
 aproximadamente 20 átomos de carbono y p es 0 ó 1; E es
 R^b , un grupo protector del carboxílico terminal, un comple-
 20 jo de hidróxido de metal o una sal de adición de ácido,
 en el que R^b es OR^e ó $\text{-NR}^c\text{R}^d$, en donde R^e es hidrógeno o
 alcohilo de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, o
 arilo o aralcohilo de 6 a aproximadamente 24 átomos, y R^c
 y R^d son iguales o diferentes y son hidrógeno o alcohilo
 25 inferior o son alcohileno y juntos forman una estructura
 cíclica que incluye al átomo de nitrógeno al que están
 unidos; R^4 es H, alcohilo de 1 a 20 átomos de carbono,
 acilo de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, tetra-
 hidropiraniolo, o metal monovalente; t es 0 a 5; x es 0 a
 5, en el que la suma de t y x es 0 a 5; y una

30

.....

1 de sus sales farmacéuticamente aceptables.

2ª.- El método según la reivindicación 1ª, en el que el compuesto preparado tiene la fórmula

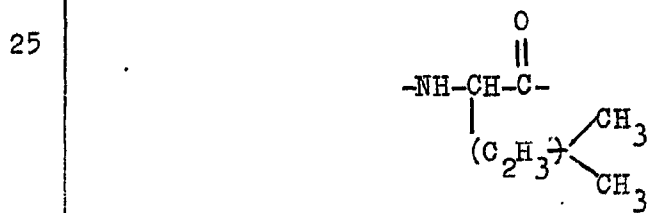


3ª.- El método según las reivindicaciones 1ª o 2ª, en el que en el compuesto preparado el resto



20 es treonilo, y B, si es ópticamente activo, está en la configuración L.

4ª.- El método según las reivindicaciones 1ª, 2ª, o 3ª, en el que en el compuesto preparado el resto



30 es leucilo.

1 5ª.- El método según las reivindicaciones 1ª,
2ª, 3ª o 4ª, en el que en el compuesto preparado A y B
son restos de péptidos iguales o diferentes seleccionados
5 del grupo que consiste en prolilo, treonilo, alotreonilo,
leucilo, isoleucilo, glicilo, serilo, arginilo, fenilalana-
nilo, glutamilo, aspártico y alanilo.

6ª.- El método según cualquiera de las reivindi-
caciones 1ª a 5ª, en el que en el compuesto HR^{a} es ace-
tilo.

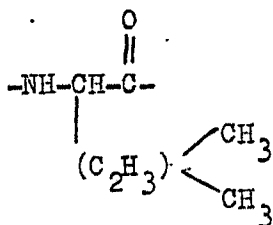
10 7ª.- El método según cualquiera de las reivin-
dicaciones 1ª a 6ª, en el que en el compuesto R^{b} es meto-
xi.

15 8ª.- El método según cualquiera de las reivin-
dicaciones 1ª a 6ª, en el que en el compuesto R^{b} es
 $-\text{NH}_2$.

9ª.- El método según cualquiera de las reivin-
dicaciones 1ª a 6ª, en el que en el compuesto R^{b} es $-\text{OH}$.

10ª.- El método según cualquiera de las reivin-
dicaciones 1ª a 9ª, en el que en el compuesto el resto

20



25

es D-leucilo.

11ª.- El método según las reivindicaciones 1ª
o 2ª, en el que el compuesto es L-treonil-L-valil-D-leu-
cina.

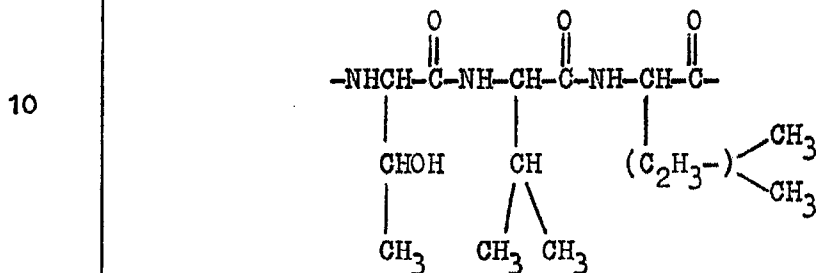
30

•••••

1 12ª.- El método según las reivindicaciones 1ª o 2ª,
en el que el compuesto es fenilalanilproliltreonilvalil-leu-
cilprolil-fenilalanina.

5 13ª.- El método según las reivindicaciones 1ª o 2ª,
en el que el compuesto es N-acetiltreonilvalil-leucinamida.

14ª.- El método según cualquiera de las reivindica-
ciones 1ª a 9ª, en el que en el compuesto los restos



son L-treonil-L-valil-L-leucina.

15 15ª.- UN METODO MEJORADO PARA PREPARAR UN POLIPEP-
TIDO.

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

20 Esta Memoria consta de SESENTA Y SIETE hojas escri-
tas a máquina por una sola cara.

Madrid, 04.06.1977

P.A.

Alberto de Elzaburo
Por Poderes

25

~~30~~
27097

VAL