

20 SET. 1978



ESPAÑA

Concedido el Registro de acuerdo
con los datos que figuran en la pre-
sente descripción y según el con-
tenido de la Memoria adjunta.

RAN 4105/19-001

PATENTE DE INVENCION

19 ES

11 NÚMERO 467453
22 FECHA DE PRESENTACION

10 A 1

30 PRIORIDADES: 31 NÚMERO 667.747	32 FECHA 17 Marzo 1976	33 PAIS U.S.A.
---	-------------------------------	-----------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07C A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA 456.901 del 16 Marzo de 1977.
------------------------	--	--

64 TÍTULO DE LA INVENCION "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE HENTRIACONTAPEPTIDOS".
--

71 SOLICITANTE (S) F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE BASILEA (Suiza)
--

72 INVENTOR (ES) Choh Hao Li

73 TITULAR (ES) F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A.
--

74 REPRESENTANTE D. JAIME ISERN CUYAS, Agente Oficial de la Propiedad Industrial.
--

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a hentriaconta - péptidos que tienen la secuencia

5. H-Tyr-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-
Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-R¹-Lys-Asn I
Ala-R²-Lys-Lys-Gly-R³-OH

en donde

- R¹ es Ile o Val;
R² es His o Tyr y
10. R³ es Gln o Glu,

especialmente a un hentriacontapéptido de la secuencia

15. H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-
Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile- Ia
-Ile-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln-OH
y a un procedimiento para su preparación.

Por conveniencia el hentriacontapéptido de la secuencia Ia se denominará a continuación beta-endorfina.

El procedimiento para la preparación de los hentriacontapéptidos de la secuencia I se caracteriza por

20. a) aislar un compuesto de esta índole de fuentes naturales utilizando procedimientos bien conocidos en el arte o
b) sintetizar un compuesto de esta índole utilizando sin tesis de péptidos de fase sólida convencional.

25. El aislamiento de la beta-endorfina de las fuentes naturales puede llevarse a cabo utilizando procedimientos bien conocidos en el arte. Las fuentes naturales preferidas para este material incluyen las glándulas pituitarias ovinas, de preferencia las pituitarias del camello.

- Así pues, por ejemplo, se someten pituitarias de camello completas a extracción de acetona ácida para obtener la fracción D que, a su vez, se cromatografía sobre una columna de carboximetil-celulosa para proporcionar el componente N tal como se describe por Li y col., *Biochemistry* 14, 947 (1975). La purificación del componente N se lleva a cabo utilizando procedimientos de filtración de gel y electroforesis, de por sí conocidos, para obtener la beta-endorfina deseada.
- 5.
10. La identificación del contenido aminoácido y la secuencia de beta-endorfina a partir de fuentes naturales puede obtenerse mediante digestión enzimática de la beta-endorfina derivada del componente N purificado utilizando digestión de tripsina y subtilisina de forma convencional.
15. Luego se cartografían los digeridos mediante cromatografía seguida de electroforesis de alta tensión. Después del revelado de las manchas con ninhidrina y cluación, se encuentra que la digestión de tripsina produce once manchas mientras que la digestión de subtilisina da diez manchas. Se eluyen las manchas y se determina el contenido de aminoácidos mediante un analizador automático, mientras que la secuencia de aminoácido se determina mediante el procedimiento dansyl-Edman. La utilización de estos procedimientos determina que la beta-endorfina es un hentriacontapéptido que tiene un contenido de aminoácidos y secuencia tal como se ha expuesto anteriormente.
- 20.
- 25.

La síntesis de beta-endorfina puede llevarse a cabo utilizando técnicas de fase sólida bien conocidas ahora en el arte. En un procedimiento preferido la gluta-

mina amino protegida, que representa el grupo -COOH terminal de la beta-endorfina, se acopla a una resina de síntesis peptídica de fase sólida convencional tal como bencidrila-
mina-poliestireno reticulado con divinil-benceno al 1-2%.

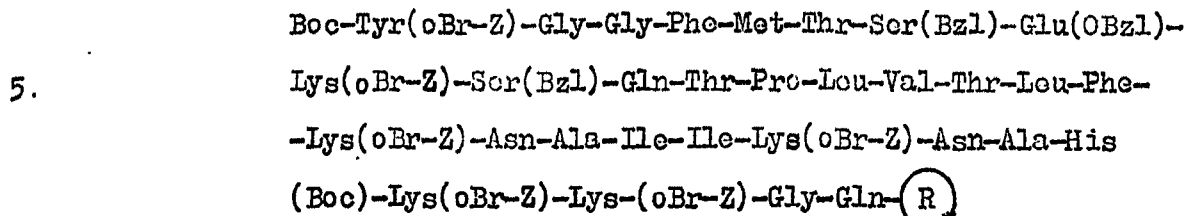
5. Luego se separa selectivamente el grupo amino protector utilizando un reactivo apropiado cuya naturaleza dependerá del grupo protector utilizado. En una modalidad preferida se utiliza el grupo t-butiloxi-carbonílico (Boc) para la protección del grupo amínico y el ácido trifluoroacético al 50% en cloruro de metileno es el agente desprotector selectivo.

15. Después de la desprotección, se trata la glutamina-resina con glicina amino protegida, de preferencia N-Boc-glicina, más preferentemente como el anhídrido simétrico preformado de N-Boc-glicina en forma de por sí conocida para formar un enlace peptídico entre el grupo amínico libre del radical glutamínico y el grupo carboxílico de glicina.

20. El ciclo de desprotección y acoplamiento con los anhídridos simétricos preformados de aminoácidos protegidos se repite luego con los aminoácidos restantes en el orden de secuencia de beta-endorfina. Algunos de los aminoácidos requieren grupos de bloqueo de cadena lateral además de la protección alfa-amino. Estos aminoácidos y los grupos de bloqueo utilizados son los siguientes :

25. Glu(OBzl), Ser(Bzl), Lys(oBr-Z) Tyr(oBr-Z) e His(Boc)
en donde oBr-Z es orto bromo-benciloxicarbonilo,
Bzl es bencilo y
Boc tiene el significado antes indicado.

El completado de la síntesis proporciona el siguiente heptriacontapéptido protegido acoplado a la resina copolimérica de estireno-divinilbenzeno:



en donde

10. oBr-Z, Bzl y Boc tienen el significado antes indicado y **(R)** es el copolímero de estireno-divinilbenzeno al 1%.

15. El desacoplamiento del péptido de la resina se lleva a cabo mediante tratamiento con fluoruro de hidrógeno líquido con disociación concomitante de todos los grupos protectores para producir la beta-endorfina deseada.

20. A pesar de que la beta-endorfina tiene la secuencia de aminoácidos del residuo 61-91 de la hormona de beta-lipotropina, la actividad lipolítica de la beta-endorfina es muy baja en comparación con la hormona completa. Sin embargo, la beta-endorfina tiene notable actividad agonista opiácea y es útil, por consiguiente, como un potente agente analgésico no adictivo. La beta-endorfina sintética y natural tiene propiedades físicas y biológicas idénticas.

25. Los análogos de la beta-endorfina que se definen por medio de la secuencia I corresponden a la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la beta-lipotropina correspondiente de la hormona porcina y humana. Estos se preparan, convenientemente, siguiendo la síntesis de péptidos de fase sólida convencional en analogía a la descrita para la beta-

endorfina mediante sustitución del aminoácido alternativo apropiado en esta síntesis.

- Los compuestos del presente invento pueden utilizarse como medicamentos en forma de preparados farmacéuticos con liberación directa o retardada del ingrediente activo que los contengan en asociación con un material de vehículo farmacéutico compatible. Este material de vehículo puede ser un material de vehículo inerte orgánico apropiado para aplicación enteral, percutánea o parenteral tal como
5. agua, gelatina, goma arábica, lactosa, almidón, estearato de magnesio, talco, aceites vegetales, polialquilenglicoles, vaselina, etc. Los preparados farmacéuticos pueden adoptar forma sólida (por ejemplo de pastillas, grageas, supositorios o cápsulas), forma semisólida (por ejemplo pomadas) o
10. forma líquida (por ejemplo de soluciones, suspensiones o emulsiones). En caso necesario los preparados farmacéuticos pueden esterilizarse y/o contener sustancias coadyuvantes tales como conservadores, estabilizantes, agentes humectantes o emulgentes, sales para variar la presión osmótica o
15. sustancias que actúen como amortiguadores.
- 20.

En el caso de preparados farmacéuticos para administración sistémica pueden administrarse de unos 5 a 750 mg/kg de un compuesto del invento.

- Los preparados farmacéuticos pueden prepararse en
25. forma de por sí conocida mezclando un compuesto del invento con materiales de vehículos sólidos y/o líquidos atóxicos que sean usuales en los preparados farmacéuticos y que sean apropiados para la administración terapéutica (por ejemplo aquellos materiales de vehículos antes citados) y, si se de-

sea, transformar la mezcla en la forma de dosificación farmacéutica deseada.

EJEMPLO 1

Aislamiento de beta-endorfina natural

5. Según el procedimiento de Li y col., Biochemistry 14, 947 (1975) se extrajo con acetona ácida un total de 500 glándulas pituitarias de camello completas para proporcionar la fracción D. La cromatografía de la fracción D sobre una columna de carboximetil celulosa dió 66 mg. del componente N cuya cantidad se sometió a filtración de gel sobre una columna Sephadex G-25 (fina) en ácido acético 0,1 N. Se obtuvieron seis fracciones con los rendimientos siguientes después de liofilización:
- A: 10 mg; B: 7 mg; C: 11 mg; D: 13 mg; E: 2 mg y F: 7 mg.
10. La fracción C se purificó ulteriormente mediante electroforesis preparativa sobre papel Whatman nº 3 MM en tampón de piridina-ácido acético de pH 3,7 [piridina-HOAc-H₂O = 4/40/1150 (v/v)] durante 2 horas a 400 V. La banda principal se eluyó con ácido acético 0,1 N y se liofilizó para obtener 7,5 mg de producto puro. El análisis del NH₂-terminal de este material dió solo tirosina como el grupo terminal.
15. El análisis de aminoácido se llevó a cabo sobre una muestra del producto puro según Spackman y col., Anal. Chem. 30, 1190 (1958), utilizando un analizador automático. La composición de aminoácido resultante de este producto se expone en la Tabla I.
20. La ausencia de triptofan se determinó mediante la prueba de color sobre papel según el procedimiento de Smith,
- 25.

Nature 171, 43 (1953).

TABLA I

Composición de aminoácido del componente peptídico N-fracción G

	Aminoácido	A partir de hidrolizados ácidos ^a	A partir de la secuencia
5.	Lisina	5,1	5
	Histidina	0,9	1
	Acido aspártico	2,0	2 ^b
10.	Treonina	3,2	3
	Serina	1,6	2
	Acido glutámico	2,7	3 ^c
	Prolina	0,7	1
	Glicina	3,2	3
15.	Alanina	1,7	2
	Valina	0,9	1
	Metionina	0,6	1
	Isoleucina	1,0 ^d	2
	Leucina	2,0	2
20.	Tirosina	0,9	1
	Fenilalanina	1,9	2

^a La hidrólisis ácida se llevó a cabo durante 24 horas a 110° con HCl 6 M

^b Dos asparagina.

25.

^c Suma de un ácido glutámico y dos glutamina.

^d 72 horas de hidrólisis reveló la presencia de dos residuos.

EJEMPLO 2

Determinación de estructura de la beta-endorfina natural

5. Se efectuaron digestiones enzimáticas del producto del ejemplo 1 con 1 mg de péptido y 0,02 mg de tripsina y 0,05 mg de subtilsina en tampon de pH 8,0 (acetato amónico 0,2 M) a 37°C durante 8 horas en el caso de la tripsina y 1 hora para la subtilsina. Los digeridos se cartografiaron mediante cromatografía de papel [butanol/ácido acético/agua = 4/1/5 (v/v)] y subsiguiente electroforesis de alta tensión a pH 2,0 [ácido fórmico (88%) ácido acético/agua = 218/63/719 (v/v)] durante 1 hora y media a 200 V. Los mapas se rociaron con ninhidrina al 1% en solución etanólica y se dejaron revelar en la oscuridad durante 20 horas. Las manchas se recortaron y eluyeron con solución de hidróxido amónico 0,1 N. Se secaron los eluatos en el desecador para aminoácido y análisis de secuencia. El análisis de aminoácido se llevó a cabo según Spackman y col. antes citado. La secuencia de aminoácido de los péptidos se determinó según el procedimiento Edman tal como describe Li y col.; Arch. Biochem. Biophys. 141, 705 (1970). La determinación de Asp/Asn y Glu/Gln se dedujo a partir de la movilidad sobre electroforesis de papel a pH 6,7 según Offord, Nature 211, 591 (1966). Los resultados se resumen en las Tablas 2 y 3 que siguen.

25.



TABLA 2

Composición de aminoácido² y residuo amino-terminal de péptidos trípticos y de subtilisina a partir del componente N-fracción C

5.	Amino ácido	Péptidos trípticos						Péptidos de subtilisina		
		T1	T3	T5	T6	T7	T8	T9	S7	S9
	Lys	2,2	1,1	0,9		1,0	1,0	1,0	1,1	1,0
	His	0,9	1,0							
	Asp	1,0	0,6			0,8			1,0	
10.	Thr						1,1	2,1		1,0
	Ser						1,0	0,8		1,1
	Glu			1,1	1,0		1,0	1,2		1,8
	Pro							0,8		1,1
	Gly			1,0	0,5		2,0			
15.	Ala	1,0	0,8			1,1			0,8	
	Val							1,0		
	Met						0,8			
	Ile					2,0			2,0	
	Leu							2,2		1,0
20.	Tyr						0,6			
	Phe						1,0	0,9		
	NH ₂ - (term.)Asn		Asn	Lys	Gly	Asn	Tyr	Ser	Lys	Glu

25. ^a Resultados a partir de hidrolizados de HCl 6 N a 110°C durante 24 horas excepto para T7 y S7 que se hidrolizan durante 72 horas.

TABLA 3

Análisis de secuencia sobre derivados de péptido triptico
a partir del componente N-fracción C

	<u>Péptidos^a</u>	<u>Secuencia^b</u>
5.	T8	<u>Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys</u>
	T9	<u>Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys</u>
	T7	<u>Asn-Ala-Ile-Ile-Lys</u>
10.	T3	<u>Asn-Ala-His-Lys</u>
	T5	<u>Lys-Gly-Gln</u>
	T6	<u>Gly-Gln</u>

15. ^aVéase la Tabla 2 para análisis de aminoácido
b ——— , procedimiento dansyl-Edman

20. La secuencia de la beta-endorfina se deriva del
juego de datos expuesto en la Tabla I del ejemplo 1 y las
Tablas 2 y 3 de este ejemplo. Según se expone en la Tabla
1, la arginina, cistina y triptofan están ausentes del
componente N-fracción C. En adición, este material tiene
solo un residuo cada uno de histidina, ácido glutámico,
valina, metionina y tirosina. Debido a que el radical NH₂-
terminal es tirosina, el péptido triptico T8 debe situar-
se en el NH₂-final. A partir de los datos del aminoácido
y NH₂-terminal del péptido de subtilsina S9 (tabla 2) es
evidente que T8 está enlazado a T9. De modo análogo, S7
puede proporcionar el traslapo para T9 y T7.

25. El péptido T6 tiene la glutamina de COOH-termi

nal y no lisina, pudiendo considerarse situado en el COOH-final. El péptido T5 indica la probabilidad de un enlace Lys-Lys y este viene confirmado por T1 y T3 (tablas 2 y 3). El péptido T1 sirve también para enlazar T3 y T5. Así pues, puede concluirse que la organización de los péptidos tripticos es como sigue: T8 ——— T9 ——— T7 ——— T3 ——— T5 y la secuencia de aminoácido completa del componente N-fracción C (beta-endorfina) es tal como se ha expuesto anteriormente en la descripción para el henriciacontapéptido.

5.

10.

EJEMPLO 3

Síntesis de fase sólida de beta-endorfina

Resina de N^{alfa}-Boc-alfa-bencil-gamma-glutamil-bencil-drilamina

15.

20.

25.

El enlace de alfa-bencil-N^{alfa}-t-butiloxicarbonil-glutamato a la resina de bencil-drilamina se efectuó por medio de su anhídrido simétrico. Se neutralizó una muestra (2,5 g) de resina de clorhidrato de bencil-drilamina conteniendo 0,38 mmol de amina libre por g. con diisopropiletilamina al 5% (DIEA) en CH₂Cl₂ y luego se trató con 3 equivalentes del anhídrido simétrico en CH₂Cl₂ durante 45 minutos. Luego se adicionaron 5 cc de DIEA al 5% en CH₂Cl₂ seguido de un tiempo de reacción adicional de 10 minutos. La reacción se terminó mediante filtración y lavados con tres porciones de 30 cc de CH₂Cl₂ y tres porciones de 30 cc de etanol absoluto. Después del retratamiento de la resina con la misma cantidad de anhídrido simétrico, se secó en vacío sobre P₂O₅ durante 1 hora. El completado de la reacción se verificó mediante la prueba de Gisin. Después de la hidrólisis de una muestra en ácido propiónico/HCl 12 N, el aná-

lisis de aminoácido dió un máximo correspondiente a 0,23 mmol de H^+ por g. (disociación al 68%). La identificación del producto H^+ -disociado como glutamina se confirmó mediante cromatografía de capa delgada en 1-butanol/ácido acético/agua (4:1:1 v/v) y 1-butanol/piridina/ácido acético/agua (6/6/1,2/4,6,v/v).

5.

Anhidridos simétricos de ácidos Boc-amínicos

La reacción de ácidos Boc-amínicos con N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCI) se llevó a cabo como sigue: se enfrió a 0°C 1,9 mmol de ácido Boc-amínico en 6 cc de cloruro de metileno y se mezcló con 1,6 cc de DCCI 0,6 M en cloruro de metileno. Después de agitarse durante 20 minutos a 0°C se separó el precipitado en dioxano mediante filtración a 25°C y se lavó con 2,4 cc de cloruro de metileno.

10.

El filtrado se utilizó inmediatamente para la reacción de acoplamiento.

15.

Resina de bencidrilamina beta-endorfina protegida.

La resina que acaba de describirse se sometió al proceso de síntesis siguiente:

20.

(1) Lavado con tres porciones de 15 cc de cloruro de metileno, (2) separación del grupo Boc con ácido trifluoroacético al 50% en cloruro de metileno durante 15 minutos; (3) lavado con dos porciones de 15 cc de cloruro de metileno; (4) lavado con dos porciones de 15 cc de dioxano al 50% en cloruro de metileno; (5) lavado con dos porciones de 15 cc de cloruro de metileno; (6) cinco minutos de neutralización con 15 cc de diisopropiletilamina al 5% en cloruro de metileno; (7) lavado con seis porciones de 15 cc de cloruro de metileno; (8) adición de la solución de anhídrido simétrico.

25.

co proformado de ácido Boc-amínico y sacudimiento durante 30 minutos; (9) adición de 0,20 equivalentes de diisopropil etilamina al 5% en cloruro de metileno y sacudimiento durante otros 20 minutos; (10) lavado con tres porciones de 15 cc de cloruro de metileno; y (11) lavado con tres porciones de 15 cc de etanol absoluto. El ciclo anterior se repitió para los aminoácidos N protegidos siguientes:

- Boc-Gly
- Boc-Lys(oBr-Z)
- 10. Boc-Lys(oBr-Z)
- Boc-His(Boc)
- Boc-Ala
- Boc-Asn
- Boc-Lys(oBr-Z)
- 15. Boc-Ile
- Boc-Ile
- Boc-Ala
- Boc-Asn[‡]
- Boc-Lys(oBr-Z)
- 20. Boc-Phe
- Boc-Leu`
- Boc-Thr
- Boc-Val
- Boc-Leu
- 25. Boc-Pro
- Boc-Thr
- Boc-Gln
- Boc-Ser(Bzl)
- Boc-Lys(oBr-Z)

Boc-Glu(OBzl)

Boc-Ser(Bzl)

Boc-Thr

Boc-Met

5. Boc-Phe

Boc-Gly

Boc-Gly

Boc-Tyr(oBr-Z)

- * - Después de la introducción de Asn se sacó la resina
10. peptídica (rendimiento de 4,7 g) y se separó una parte alícuota (400 mg). Luego se sometió el resto de la resina peptídica al mismo proceso para la incorporación de los residuos restantes con dos excepciones. Se utilizaron dos tratamientos con DIEA al 5% en cloruro de metileno para la neutralización y para la segunda etapa de acoplamiento de anhídrido se adicionó trifluoroetanol a una concentración del 20%.
- 15.

Beta-endorfina

20. Se sometió una muestra (0,6 g) de la resina beta-endorfina protegida a etapas de desprotección y neutralización para separar el grupo Boc. Luego se agitó la resina seca en presencia de 1,8 cc de anisol y 15 cc de HF líquido a 0°C durante 1 hora. Se separó el HF con una corriente de nitrógeno y se lavó el residuo oleoso con dos porciones
25. de 15 cc de acetato de etilo. Se extrajo el péptido de la resina con tres porciones de 15 cc de ácido acético al 50% y se evaporaron los filtrados combinados en vacío hasta volumen reducido (3 a 5 cc) y se sometieron a filtración de gel sobre Sephadex G-10 (columna de 2 x 25 cm) en ácido

- acético 0,5N. Se detectó una cresta (detección de 280 nm) y la liofilización dió 110 mg. Luego se sometió este material a cromatografía sobre carboximetilcelulosa. El aislamiento de la cresta máxima (detección de 280 nm) dió 66 mg de material.
5. La ulterior purificación de este material se efectuó mediante cromatografía fraccionada sobre Sephadex G-50. El aislamiento del material representado por la cresta máxima [detección de Folin-Lowry] ($R_F = 0,21$) dió 52 mg de beta-endorfina altamente purificada (rendimiento del 19,6% basado en la resina de partida).
10. Sobre cromatografía de capa delgada en n-butanol/ piridina/ácido acético glacial/agua (15/10/3/12, v/v), el material purificado (50 microgramos) dió una mancha (detección de ninhidrina) con un valor R_F de 0,35. Sobre electroforesis de papel la beta-endorfina sintética (muestras de 50 microgramos) dió una sola mancha en ambos pH de 3,7 y 6,9 con valores R_F respectivos (con respecto a Lys) de 0,65 y 0,42. La electroforesis del material purificado (100 microgramos) también dió una banda simple a pH 4,5 durante 1 hora. Se sometió también una muestra (1 mg) a electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. Solo se observó una banda (detección mediante precipitación con ácido tricloroacético al 12%) con un pI aproximado de 10,0. El análisis de aminoácido después de hidrólisis dió: Lys_{5,2}, His_{0,9}, Asp_{2,2}, Thr_{3,0}, Ser_{2,1}, Glu_{2,1}, Pro_{1,1}, Gly_{3,0}, Ala_{2,1}, Val_{1,1}, Met_{0,9}, Ile_{1,5}, Leu_{2,2}, Tyr_{1,0} y Phe_{2,2}. El análisis de aminoácido después de digestión enzimática completa (primero con tripsina y ciotripsina, y luego con amino-peptidasa de leucina) dió: Lys_{3,0}, His_{1,0}, Thr_{3,2}, (Ser, Asn, Gln)_{3,2}, Glu_{1,1}, Pro_{0,9}, Gly_{3,0}, Ala_{2,1}, Val_{1,0}, Met_{1,2}, Ile_{2,0}, Leu_{2,1}, Tyr_{1,1}.

y Phe_{1,8}

EJEMPLO 4

Actividad biológica de beta-endorfina

5. La actividad agonista opiácea de la beta-endorfina natural se determinó con el método de Simon y col., Pro. Nat. Acad. Sci. 70, 1947 (1973) utilizando membranas del cerebro de cobayo. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4 que sigue:

TABLA 4

10. Actividad agonista opiácea de Beta_s-LPH-(61-91) mediante ensayo de ligazón recéptico

Preparación	Dosis (10 ⁻⁷ M)	(ng)	Respuesta ^a
Normorfina	0,7	0,019	28 ± 0,8
15. Beta _s -LPH-(61-91) ^b	7,0	0,190	70 ± 0,9
	1,0	0,343	60 ± 0,7
	10,0	3,438	83 ± 0,2

^a Porcentaje de inhibición de ligazón esteroespecífica.

20. Error medio estandar ± a partir de 4 determinaciones.

^b Potencia relativa frente a la normorfina, 342% con un límite de fiabilidad de 300-392 y lambda = 0,044.

25. De la tabla que precede se aprecia que la beta-endorfina tiene una potente actividad agonista opiácea; siendo su potencia de 3,42 veces la de la normorfina sobre una base molar.

La actividad lipolítica de la beta-endorfina natural se comparó con la actividad de la hormona de beta-lipotropina ovina en células grasas de conejo utilizando el

procedimiento de Li y col., Arch. Biochem. Biophys. 169, (1975) los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.

TABLA 5

Actividad lipolítica de la hormona de beta-lipotropina y beta-endorfina natural

5.

Preparación	Dosis	Respuesta ^a
Hormona de beta-lipotropina	0,37	3,24 ± 0 5,71 ± 19
10. beta-endorfina natural	1,1 10,0	0,66 ± 0,28 1,42 ± 0,37
Control	0	0,74 ± 0,06

^a Micromol de producción de glicerol por gramo de células por hora. Determinaciones por triplicado. Valores en error medio estandard ±.

15.

EJEMPLO 5

Análogo de beta-endorfina análogo a la secuencia de beta-lipotropina porcina

20.

Se repitió el procedimiento del ejemplo 3 con la excepción de que el segundo aminoácido Boc-Ile se substituyó por Boc-Val para producir, de este modo, un análogo de beta-endorfina con una secuencia de aminoácido de la sección correspondiente de la beta-lipotropina porcina

25.

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln-OH.

EJEMPLO 6

Análogo de beta-endorfina análogo a la secuencia de beta-

-lipotropina humana.

Se repitió el procedimiento del ejemplo con la excepción de que el grupo terminal carboxílico utilizado es Boc-Glu(Bzl) y Boc-His(Boc) se sustituyó por Boc-Tyr(OBr-Z)

5. para producir de este modo un análogo de beta-endorfina con una secuencia de aminoácido como sigue:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-
-Pro-Ieu-Val-Thr-Ieu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-
-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu-OH

10. que corresponde a la porción de la beta-lipotropina humana.

EJEMPLO 7

Formulación parenteral

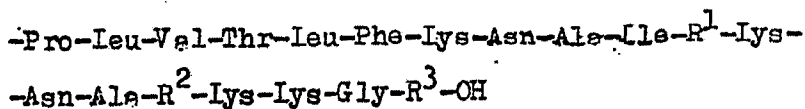
15. Se subdividió una solución estabilizada de beta-endorfina en agua destilada en ampollas o viales estériles en una cantidad que proporcionara 50 mg de péptido por vial. Luego se sometieron los contenedores a liofilización para proporcionar el producto en forma de un sólido estéril seco. La beta-endorfina puede reconstituirse para inyección mediante la adición de solución salina isotónica.

20. REIVINDICACIONES

25. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones como divisionales de la patente de invención nº 456.901, del 16 de Marzo de 1976, con prioridad de la solicitud de patente norteamericana núm. 667.747 de 17 de marzo de 1976.

1. Un procedimiento para la preparación de hen-triacontapéptidos, de la secuencia

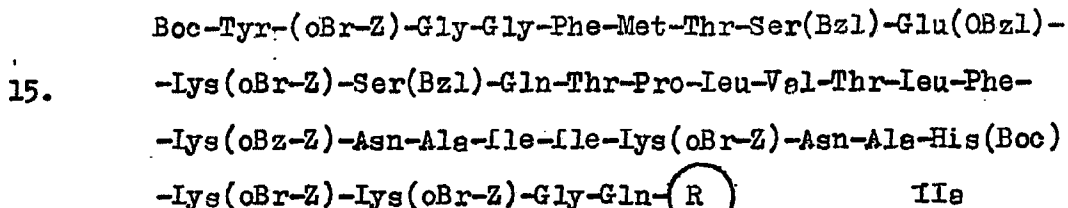
H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-



en donde

5. R^1 es Ile o Val;
 R^2 es His o Tyr y
 R^3 es Gln o Glu,

caracterizado porque en su realización comprende sintetizar un compuesto de esta índole según la técnica convencional de síntesis en fase sólida de péptidos, preferentemente por acoplamiento en una primera etapa a una resina de síntesis del tipo copolímero de estireno-vinilbenceno, para formar el péptido protegido de la fórmula



en donde

20. OBr-Z es o-bromobenciloxicarbonilo;
Bzl es bencilo;
Boc es t-butiloxicarbonilo y
 (R) es un resina copolimérica de estireno-divinil-benceno ,

25. en el cual se desocpla el péptido de la resina copolimérica mediante tratamiento con fluoruro de hidrógeno líquido, con disociación concomitante de todos los grupos protectores peptídicos.

2. Un procedimiento para la preparación de heptacosapéptidos.

Según se describe y reivindica en la presente


memoria descriptiva que conste de 21 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 1 MAR. 1978

p.e.

JAIME ISERN

p. p.



Firmado: JESUS PICAZO