

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

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

**PATENTE DE INVENCION**

ES	11	NUMERO	A1
	21	469.004	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		20.4.78	

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
	31	NUMERO			
		789,473	21.4.77		ESTADOS UNIDOS
		874,173	1.2.78		ESTADOS UNIDOS

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C07C/A61K		

64	TITULO DE LA INVENCION
	"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE SOMATOSTATINA".

71	SOLICITANTE (ES)
	ELI LILLY AND COMPANY

	DOMICILIO DEL SOLICITANTE
	307 East McCarty Street - Indianapolis, Indiana - ESTADOS UNIDOS

72	INVENTOR (ES)
	James Adwin Shields y Tsung-Min Lin, ambos de nacionalidad estadounidense.

73	TITULAR (ES)

74	REPRESENTANTE
	D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1           Esta invención se relaciona con un procedimiento para  
preparar los tetradecapéptidos Y-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-  
L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH, fórmula  
I, en donde Y es D-Val o D-Ala, así como con sus sales de  
5           adición de ácido farmacéuticamente aceptables y con los in-  
termediarios producidos durante la síntesis de los tetradeca-  
péptidos.

10           La somatostatina (también conocida como factor que in-  
hibe la liberación de la somatotropina) es un tetradecapépti-  
do de la fórmula L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-  
Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH. Este tetradeca-  
péptido es aislado de extractos hipotalámicos ovinos y se ha  
encontrado que es activo en la inhibición de la secreción de  
la hormona del crecimiento (GH), también conocida como soma-  
15           totropina. A este respecto, véase P. Brazeau, W. Vale, R.  
Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, y R. Guillemin, Scien-  
ce, 179, 77 (1973).

20           Además, el compuesto convenientemente designado como  
D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina fue dado a conocer anteriormente por  
Brown y colaboradores, Endocrinology, 98, No. 2, 336-343  
(1976).

25           Los tetradecapéptidos biológicamente activos de la  
fórmula I tienen la fórmula definida anteriormente e inclu-  
yen las sales de adición de ácido no tóxicas de los mismos.  
Sus estructuras difieren de la de la somatostatina por la  
presencia de un resto de D-triptófano en la posición 8 en lu-  
gar de un resto de L-triptófano y un resto de D-valina o un  
resto de D-alanina en la posición 1, en lugar de un resto de  
L-alanina. Por razones de conveniencia, los tetradecapépti-  
30           dos de la fórmula I pueden denominarse como D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-

1 somatostatina; y D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina.

De esta manera, esta invención se relaciona con un procedimiento para preparar un compuesto seleccionado de aquellos de la fórmula H-Y-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe  
5 -D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH y con sus sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables y, como intermediarios, R-Y-Gly-L-Cys(R<sub>1</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp(R<sub>5</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Phe-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Ser-(R<sub>4</sub>)-L-Cys(R<sub>1</sub>)-X, fórmula II; en donde

10 Y es D-Val o D-Ala;

R es hidrógeno o un grupo protector de α-amino;

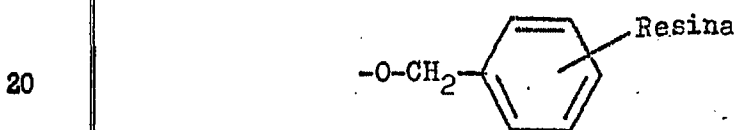
R<sub>1</sub> es hidrógeno o un grupo protector de tio;

R<sub>2</sub> es hidrógeno o un grupo protector de ε-amino;

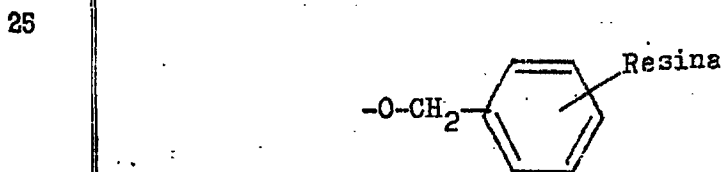
15 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno de ellos hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo;

R<sub>5</sub> es hidrógeno o formilo; y

X es hidroxilo o



en donde la resina es poliestireno; con la condición de que, cuando X es hidroxilo, cada una de R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son hidrógeno y, cuando X es



30 cada una de R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son diferentes de hidrógeno.

Los tetradecapéptidos nuevos de la fórmula I, H-Y-Gly-

1 L-Cys-L-Lys-L-Ans-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-  
L-Ser-L-Cys-OH, en donde Y es D-Val o D-Ala, se preparan ha-  
ciendo reaccionar los tetradecapéptidos de cadena lineal co-  
rrespondientes de la fórmula III,

5 Y-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-  
L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH,

en donde Y es D-Val o D-Ala, con un agente de oxidación. Es-  
ta reacción convierte los dos grupos sulfhidrilo en un puen-  
te de disulfuro.

10 Las sales de adición de ácido no tóxicas farmacéutica-  
mente aceptables incluyen las sales de adición de ácido orgá-  
nico e inorgánico, por ejemplo, aquellas preparadas a partir  
de ácidos tales como ácidos clorhídrico, sulfúrico, sulfóni-  
co, tartárico, fumárico, bromhídrico, glicólico, cítrico, ma-  
15 leico, fosfórico, succínico, acético, nítrico, benzoico, as-  
córbico, p-toluensulfónico, bencensulfónico, naftalensulfóni-  
co y propiónico. De preferencia, las sales de adición de áci-  
do son aquellas que se preparan a partir de ácido acético.

20 Cualesquiera de las sales anteriores se preparan por medio  
de los métodos convencionales.

También se consideran dentro del alcance de esta in-  
vención los intermediarios de fórmula II R-Y-Gly-L-Cys(R<sub>1</sub>)-L-  
-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp(R<sub>5</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-  
Phe-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Ser(R<sub>4</sub>)-L-Cys(R<sub>1</sub>)-X, en donde los diversos  
25 símbolos son como se define anteriormente. Ejemplos de estos  
intermediarios son:

R-D-Val-Gly-L-Cys(R<sub>1</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp(R<sub>5</sub>)-  
L-Lys-(R<sub>2</sub>)-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Phe-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Ser(R<sub>4</sub>)-L-Cys(R<sub>1</sub>)-X;

y

30 R-D-Ala-Gly-L-Cys(R<sub>1</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp(R<sub>5</sub>)-

1 L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Phe-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Ser(R<sub>4</sub>)-L-Cys(R<sub>1</sub>)-X.

Un intermediario preferido es el siguiente intermedia-  
rio de la fórmula III,

5 Y-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-  
L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH,


en donde Y se define como antes.

Otros intermediarios preferidos son los siguientes:


10 H-D-Val-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-  
L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-  
L-Ser-L-Cys-OH;

H-D-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-  
L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-  
L-Ser-L-Cys-OH;

15 N-(BOC)-D-Val-Gly-L(PMB)Cys-L-(CBzOC)-  
Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-(CBzOC)-  
Lys-L-(Bzl)Thr-L-Phe-L-(Bzl)Thr-L-

(Bzl)Ser-L-(PMB)Cys-O-CH<sub>2</sub>-Resina ; Y.

20 N-(BOC)-D-Ala-Gly-L-(PMB)Cys-L-(CBzOC)-  
Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-(CBzOC)Lys-  
L-(Bzl)Thr-L-Phe-L-(Bzl)Thr-L-(Bzl)Ser-L-

(PMB)Cys-O-CH<sub>2</sub>-Resina

25 Las fórmulas anteriores que definen los intermedia-  
rios incluyen los grupos de protección para las funciones  
amino, hidroxí y tio (sulfhidrilo). Las propiedades de un  
grupo de protección como se define en la presente, son do-  
bles. En primer lugar, el grupo de protección evita que una  
porción reactiva presente en una molécula particular sufra  
reacción durante el sometimiento de la molécula a condicio-  
nes que pudieran causar la ruptura de la porción de otra fór-  
30 ma activa. En segundo lugar, el grupo de protección es tal

1 que puede separarse fácilmente con la restauración de la por-  
ción activa original y bajo condiciones que no afectarían in-  
deseablemente otras porciones de la molécula. Los grupos que  
son útiles para estos propósitos, es decir, para proteger  
5 los grupos amino, hidroxilo y tio, son bien conocidos por los  
expertos en la técnica. Indudablemente, se han editado volú-  
menes completos dirigidos específicamente a una descripción  
y discusión de los métodos para utilizar dichos grupos. Uno  
de dichos volúmenes es el tratado Protective Groups in Orga-  
10 nic Chemistry, J.F.W. McOmie, Editor, Plenum Press, New York,  
1973.

En las fórmulas anteriores que definen los intermedia-  
rios, R representa ya sea el hidrógeno en el  $\alpha$ -amino o un  
grupo de protección de  $\alpha$ -amino. Los grupos de protección de  
15  $\alpha$ -amino considerados para R son bien conocidos por aquellos  
con experiencia ordinaria en la técnica de los péptidos. Mu-  
chos de éstos se detallan en McOmie, citado anteriormente,  
Capítulo 2, escrito por J.W. Barton. Son ilustrativos de ta-  
les grupos de protección los siguientes: benciloxicarbonilo,  
20 p-clorobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, o-cloro-  
benciloxicarbonilo, 2,6-diclorobenciloxicarbonilo, 2,4-diclo-  
robenciloxicarbonilo, o-bromobenciloxicarbonilo, p-metoxiben-  
cilocarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, t-butiloxicarbo-  
nilo (BOC), t-amiloxicarbonilo, 2-(p-bifenilil)isopropiloxi-  
25 carbonilo (BpOC), adamantiloxicarbonilo, isopropiloxicarb-  
nilo, ciclopentiloxicarbonilo, ciclohexiloxicarbonilo, ciclo-  
heptiloxicarbonilo, trifenilmetilo (trilito) y p-toluensulfo-  
nilo. De preferencia, el grupo protector de  $\alpha$ -amino definido  
por R es t-butiloxicarbonilo.

30  $R_1$  representa ya sea el hidrógeno del grupo sulfhidri-

1 lo de la cisteína o un grupo de protección para el sustituyente sulfhidrilo. Muchos de estos grupos de protección se describen en McOmie, citado anteriormente, Capítulo 7, escrito por R.G. Hickey, V.R. Rao y W.G. Rhodes. Son ejemplos adecuados de tales grupos de protección los siguientes: p-metoxibencilo, bencilo, p-tolilo, benzhidrilo, acetamidometilo, 5 tritilo, p-nitrobencilo, t-butilo, isobutiloximetilo, así como también cualesquiera de un número de derivados de tritilo. Para grupos adicionales, véase, por ejemplo, Houben-Weyl, Methodes der Organischen Chemie, "Synthese von Peptiden", Volúmenes 15/1 y 15/2, (1974), Stuttgart, Alemania. De preferencia, el grupo de protección de sulfhidrilo definido por  $R_1$  es p-metoxibencilo.

15  $R_2$  representa ya sea el hidrógeno en la función  $\epsilon$ -amino del resto de lisina o un grupo de protección  $\epsilon$ -amino adecuado. Son ilustrativos de tales grupos la mayoría de los mencionados anteriormente como adecuados para usarse como un grupo de protección  $\epsilon$ -amino. Se incluyen como típicos de tales grupos los siguientes: benciloxycarbonilo, t-butiloxycarbonilo, 20 t-amiloxycarbonilo, ciclopentiloxycarbonilo, adamantiloxycarbonilo, p-metoxibenciloxycarbonilo, p-clorobenciloxycarbonilo, p-bromobenciloxycarbonilo, o-clorobenciloxycarbonilo, 2,6-diclorobenciloxycarbonilo, 2,4-diclorobenciloxycarbonilo, o-bromobenciloxycarbonilo, p-nitrobenciloxycarbonilo, 25 isopropiloxycarbonilo, ciclohexiloxycarbonilo, cicloheptiloxycarbonilo y p-toluensulfonilo.

30 Como se hará evidente posteriormente, el procedimiento para la preparación de los tetradecapéptidos de fórmula I incluye un clivaje periódico del grupo protector  $\epsilon$ -amino a partir del ácido amino presente en la cadena péptida.

1 De esta forma, la única limitación con respecto a la identidad  
del grupo protector  $\epsilon$ -amino en el residuo de lisina es tal que  
no se efectuará su clivaje en condiciones empleadas para el cli-  
vaje selectivo del grupo protector  $\alpha$ -amino. La selección apro-  
5 piada de los grupos protectores  $\alpha$ -amino y  $\epsilon$ -amino es algo conocido  
por el químico y depende de la relativa facilidad con la que  
un grupo protector en particular puede ser clivado. Así, grupos  
tales como 2-(p-bifenil)isopropiloxicarbonil(BpOC) y trietilo  
son muy adaptables y pueden clivarse aún en presencia de un ácido  
10 suave. Un ácido moderadamente fuerte tal como el ácido clorhídrico,  
trifluoracético o trifloruro de boro en ácido acético es  
el que se requiere para clivar otros grupos tales como p-butilo-  
xicarbonilo, t-amiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, y p-  
metoxibenciloxicarbonilo. Se requieren condiciones ácidas más  
15 fuertes para efectuar el clivaje de otros grupos protectores ta-  
les como el benciloxicarbonilo, alobenciloxicarbonilo, p-nitro-  
benciloxicarbonilo, cicloalquilocarbonilo e isopropiloxica-  
bonilo. El clivaje de estos últimos grupos requiere unas condi-  
ciones ácidas muy fuertes tales como el uso de bromuro de hidró-  
20 geno, fluoruro de hidrógeno o trifluoracetato de boro en ácido  
trifluoracético. Por supuesto, cualquiera de los grupos anterio-  
res puede clivarse en condiciones ácidas más fuertes. La selec-  
ción apropiada de los grupos protectores amino incluirán el uso  
de los grupos en la función  $\alpha$ -amino que es más adaptable que la  
25 empleada en el grupo protector  $\epsilon$ -amino conjuntamente con las  
condiciones de clivaje designadas para separar selectivamente  
unicamente la función  $\alpha$ -amino. En este contexto, R2 es preferi-  
blemente o-clorobenciloxicarbonilo o ciclopentiloxicarbonilo  
y, en conjunción con esto, el grupo protector  $\alpha$ -amino que se elija  
30 para usar en cada uno de los ácidos amino que se agregan a la cade

1 na de péptido es preferiblemente t-butiloxicarbonilo.

Los grupos  $R_3$  y  $R_4$  representan el hidrógeno del hidroxilo o un grupo de protección para el hidroxilo alcohólico de la treonina y la serina, respectivamente. Muchos de tales grupos de protección se describen en McOmie, citado anteriormente, Capítulo 3, escrito por C.B.Reese. Son típicos de tales grupos de protección los siguientes, por ejemplo, alquilo de  $C_1$  a  $C_4$ , tales como metilo, etilo y t-butilo; bencilo; bencilo sustituido, tal como p-metoxibencilo, p-nitrobencilo, p-clorobencilo y o-clorobencilo; 5 alcanoilo de  $C_1$  a  $C_3$ , tal como formilo, acetilo y propionilo; tri-fenilmetilo (tritilo). De preferencia, cuando  $R_3$  y  $R_4$  son grupos de protección, el grupo de protección de elección en ambos casos es bencilo. 10

El grupo  $R_5$  representa ya sea hidrógeno o formilo y define la porción  $>NR_5$  del resto de triptófano. El formilo sirve como un grupo de protección. El empleo de dicho grupo de protección es opcional y, por lo tanto,  $R_5$  puede ser apropiadamente hidrógeno (N-no protegido) o formilo (N-protegido). 15

El grupo X se refiere al extremo carboxílico de la cadena de tetradecapéptido; puede ser hidroxilo, en cuyo caso se define un grupo carboxilo libre. Además X representa el soporte de la resina sólida al cual se une el extremo carboxílico del péptido durante su síntesis. Esta resina sólida se representa por medio de la fórmula 20

25



En cualquiera de los anteriores, cuando X representa hidroxilo, cada una de  $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$  y  $R_5$  es hidrógeno. Cuando X representa el soporte de la resina sólida, cada una de  $R$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  y  $R_4$  es un grupo de protección. 30

1           Se emplean aquí las siguientes abreviaturas, la mayoría de las cuales son bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica:

Ala - Alanina

5           Asn - Asparagina

Cys - Cisteína

Gly - Glicina

Lys - Lisina

Phe - Fenilalanina

10          Ser - Serina

Thr - Treonina

Trp - Triptófano

Val - Valina

DCC - N,N'-diciclohexilcarbodiimida

15          DMF - N,N-dimetilformamida

BOC - t-butiloxicarbonilo

PMB - p-metoxibencilo

CBzOC - o-clorobenciloxicarbonilo

CPOC - ciclopentiloxicarbonilo

20          Bzl - Bencilo

For - Formilo

BpOC - 2-(p-bifenilil)isopropiloxicarbonilo

25          Aunque la selección de los grupos de protección particulares que deben emplearse en la preparación de los compuestos de la fórmula I es materia bien conocida dentro de la experiencia ordinaria de un químico en la técnica de los péptidos sintéticos, es conveniente reconocer que la secuencia de reacciones que debe llevarse a cabo da lugar a una selección de los grupos de protección particulares. En otras palabras,  
30          el grupo de protección de elección debe ser uno que sea esta

1 ble tanto a los reactivos como a las condiciones empleadas  
en las etapas sucesivas de la secuencia de reacción. Por  
ejemplo, como ya se discutió en cierto grado en lo que ante-  
cede, el grupo de protección particular que se emplea debe  
5 ser uno que pertenezca intacto bajo las condiciones utiliza-  
das para disociar el grupo de protección de  $\alpha$ -amino del res-  
to de aminoácido terminal del fragmento de péptido en la pre-  
paración para la copulación del subsiguiente fragmento de  
aminoácido con la cadena de péptido. También es importante  
10 seleccionar, como grupo de protección, uno que permanezca in-  
tacto durante la formación de la cadena de péptido y que se  
pueda separar fácilmente al completarse la síntesis del pro-  
ducto de tetradecapéptido deseado. Todas estas materias que-  
dan dentro del conocimiento y entendimiento de un químico de  
15 péptidos con experiencia ordinaria en la técnica.

Como es evidente de la discusión anterior, los tetra-  
decapéptidos de la fórmula I pueden prepararse por medio de  
síntesis de fase sólida. Esta síntesis involucra una forma-  
ción secuencial de la cadena de péptido empezando en el ex-  
tremo C-terminal del péptido. Específicamente, la cisteína  
20 primeramente se une en su función carboxilo a la resina por  
medio de la reacción de una cisteína amino-protegida, S-pro-  
tegida con una resina clorometilada o una resina hidroximeti-  
lada. La preparación de una resina de hidroximetilo está des-  
crita por Bodonszky y colaboradores, Chem. Ind. (Londres),  
25 38 1597-98 (1966). La resina clorometilada se puede conse-  
guir comercialmente de Lab. Systems, Inc., San Mateo, Cali-  
fornia, E.U.A.

Al llevar a cabo la unión de la cisteína C-terminal a  
30 la resina, la cisteína protegida primeramente se convierte

1 en su sal de cesio. Esta sal se hace reaccionar después con  
la resina de acuerdo con el método descrito por B.F, Gisin,  
5 Helv. Chim. Acta, 56, 1476 (1973). Alternativamente, la cisteína puede unirse a la resina mediante la activación de la  
función carboxilo de la molécula de cisteína mediante la  
aplicación de técnicas fácilmente conocidas. Por ejemplo, la  
cisteína puede hacerse reaccionar con la resina en presencia  
de un compuesto activador del grupo carboxilo tal como N,N'-  
15 díciclohexilcarbodiimida (DCC).

10 Una vez que la cisteína con el carboxilo libre ha sido  
unida apropiadamente al soporte de resina, el resto de la  
secuencia de formación del péptido involucra la adición en  
etapas de cada aminoácido a la porción N-terminal de la cade  
na de péptido. Por lo tanto, necesariamente la secuencia par  
15 ticular que se involucra comprende una disociación del grupo  
de protección de  $\alpha$ -amino del aminoácido que representa la  
porción N-terminal del fragmento de péptido seguido por la  
copulación del subsiguiente resto de aminoácido con el amino  
ácido N-terminal ahora libre y reactivo. La disociación del  
20 grupo de protección de  $\alpha$ -amino puede efectuarse en presencia  
de un ácido tal como ácido bromhídrico, ácido clorhídrico,  
ácido trifluoroacético, ácido p-toluensulfónico, ácido ben-  
zensulfónico, ácido naftalensulfónico y ácido acético, con  
la formación del producto respectivo de sal de adición de  
25 ácido. Otro método que hay disponible para llevar a cabo la  
disociación del grupo de protección de amino involucra el em-  
pleo de trifluoruro de boro. Por ejemplo, el eterato de die-  
tilo de trifluoruro de boro en ácido acético glacial conver-  
tirá el fragmento de péptido amino protegido en un complejo  
30 de  $BF_3$  que luego puede convertirse en el fragmento de pépti-

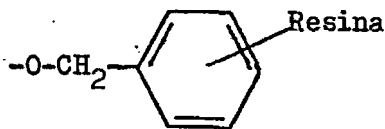
1 do desbloqueado mediante tratamiento con una base tal como  
bicarbonato de potasio acuoso. Cualesquiera de estos métodos  
puede emplearse siempre que se tenga presente que el método  
de elección debe ser uno que lleve a cabo la disociación del  
5 grupo de protección de  $\alpha$ -amino, N-terminal sin la ruptura de  
ningunos otros grupos de protección presentes en la cadena  
de péptido. A este respecto, se prefiere que la disociación  
del grupo de protección con N-terminal se lleve a cabo utili-  
zando ácido trifluoroacético. Generalmente, la disociación  
10 se llevará a cabo a una temperatura de 0°C. a la temperatura  
ambiente, aproximadamente.

Una vez que se ha efectuado la ruptura N-terminal, el  
producto que resulta normalmente estará en la forma de la  
sal de adición de ácido del ácido que se ha empleado para  
15 llevar a cabo la disociación del grupo de protección. El pro-  
ducto entonces puede convertirse en el compuesto amino  
terminal libre mediante tratamiento con una base moderada,  
típicamente una amina terciaria tal como piridina o trietila-  
mina.

20 La cadena de péptido, después, está lista para la reac-  
ción con el subsiguiente aminoácido. Esta puede llevarse a  
cabo empleando cualesquiera de las diversas técnicas conoci-  
das. Con objeto de lograr la copulación del subsiguiente ami-  
noácido con la cadena de péptido N-terminal, se emplea un  
25 aminoácido que tiene un carboxilo libre pero que está adecua-  
damente protegido en la función  $\alpha$ -amino así como también en  
cualquier otra porción activa. Después, el aminoácido se so-  
mete a condiciones que harán activa a la función carboxilo  
en la reacción de copulación. Una de tales técnicas de acti-  
30 vación que pueden emplearse en la síntesis involucra la con-

1 versión del aminoácido en un anhídrido mixto. Por lo tanto,  
la función carboxilo libre del aminoácido se activa mediante  
reacción con otro ácido, típicamente un ácido carbónico en  
la forma de su cloruro de ácido. Ejemplos de tales cloruros  
5 de ácido que pueden utilizarse para formar los anhídridos  
mixtos apropiados son cloroformiato de etilo, cloroformiato  
de fenilo, cloroformiato de butilo secundario, cloroformiato  
de isobutilo y cloruro de pivaloilo.

Otro método de activación de la función carboxilo del  
10 aminoácido para lograr la copulación consiste en la conver-  
sión del aminoácido en su derivado de éster activo. Ejemplos  
de tales ésteres activos son, por ejemplo; un éster de 2,4,5-  
triclorofenilo, un éster de pentaclorofenilo, un éster de p-  
nitrofenilo, un éster formado a partir de 1-hidroxibenzotriaz  
15 zol y un éster formado a partir de N-hidroxisuccinimida. Otro  
método para efectuar la copulación del aminoácido C-terminal  
con el fragmento de péptido involucra llevar a cabo la reac-  
ción de copulación en presencia de por lo menos una cantidad  
equimolar de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Se prefie-  
20 re este último método para preparar el tetradecapéptido de  
la fórmula II en donde X es



Una vez que se ha preparado la secuencia de aminoáci-  
do deseada, el péptido resultante puede separarse del sopor-  
te de resina. Esto se logra mediante tratamiento del tetrade-  
capéptido soportado en la resina protegida con fluoruro de  
30 hidrógeno. El tratamiento con fluoruro de hidrógeno disocia

1 el péptido de la resina; además, sin embargo, disocia todos  
los grupos de protección restantes presentes en las porcio-  
nes reactivas localizadas en la cadena de péptido así como  
también el grupo de protección de  $\alpha$ -amino presente en el ami-  
5 noácido N-terminal. Cuando se emplea fluoruro de hidrógeno  
para efectuar la disociación del péptido de la resina así co-  
mo también para separar los grupos de protección, se prefiere  
que la reacción se lleve a cabo en presencia de anisol.  
Se ha encontrado que la presencia de anisol inhibe la alquila-  
10 ción potencial de ciertos restos de aminoácido presentes en  
la cadena de péptido. Además, se prefiere que la disociación  
se lleve a cabo en presencia de mercaptano de etilo. El mer-  
captano de etilo sirve para proteger el anillo de indol del  
resto de triptófano y, además, facilita la conversión de las  
15 cisteínas bloqueadas en sus formas tiol. Asimismo, cuando R<sub>5</sub>  
es formilo, la presencia de mercaptano de etilo facilita la  
disociación del grupo formilo con fluoruro de hidrógeno.

Una vez que se ha llevado a cabo la reacción de diso-  
ciación, el producto que se obtiene es un péptido de cadena  
20 lineal que contiene 14 restos de aminoácido. Con objeto de  
obtener el producto final de la fórmula I, es necesario tra-  
tar el tetradecapéptido de cadena lineal en condiciones que  
efectúen su oxidación convirtiendo los dos grupos sulfhidri-  
lo presentes en la molécula, uno en cada porción cisteinilo,  
25 en un puente de disulfuro. Esto puede llevarse a cabo tratan-  
do una solución diluida de tetradecapéptido lineal con cua-  
lesquiera de una variedad de agentes de oxidación incluyendo,  
por ejemplo, yodo y ferricianuro de potasio. También puede  
emplearse aire como agente de oxidación, siendo generalmente  
30 el pH de la mezcla de aproximadamente 2.5 a aproximadamente

1 9.0, y de preferencia de aproximadamente 6.2 a aproximadamen  
te 7.2. Cuando se utiliza aire como agente de oxidación, la  
concentración de la solución de péptido generalmente no es  
mayor de aproximadamente 0.4 mg. del péptido por mililitro  
5 de solución, y usualmente es de aproximadamente 50 µg./ml.

Los compuestos de la fórmula I pueden administrarse a  
mamíferos de sangre caliente, incluyendo a los seres humanos  
y son particularmente útiles para relajar el músculo liso.  
Específicamente, puede relajarse el tracto gastrointestinal  
10 mediante la administración parenteral de pequeñas cantidades  
de estos compuestos, y de preferencia, de D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-so-  
matostatina. Esta acción, que da por resultado la reducción  
de la movilidad del intestino, es particularmente deseable  
en la radiografía gastrointestinal hipotónica. Estos compuest  
15 tos, además, son útiles en el tratamiento del colón espásti-  
co, piloroespasmo y de otros estados espásticos del tracto  
gastrointestinal, así como también para cólico ureteral y bi-  
liar.

Normalmente, con objeto de efectuar el relajamiento  
20 del músculo liso, estos compuestos se administran en una do-  
sis de aproximadamente 0.1 µg. a aproximadamente 3 µg. por  
kilogramo de peso de cuerpo del receptor y de preferencia de  
aproximadamente 0.3 µg. a aproximadamente 1.5 µg. por kilo-  
gramo de peso de cuerpo. La administración es parenteral y  
25 puede ser intramuscular, subcutánea o intravenosa; de prefe-  
rencia, los compuestos se administran por la vía intravenosa  
o intramuscular.

Para la administración parenteral, las formas de dosi-  
ficación de unidad de fluido generalmente se preparan utili-  
30 zando el compuesto en asociación con un portador farmacéutico,

1 tal como, por ejemplo, solución salina isotónica, glicina  
isotónica, lactosa, manitol, ácido acético diluido, agua bac  
terioestática, por ejemplo, agua que contiene aproximadamente  
5 1% de alcohol bencílico y soluciones amortiguadoras de fosfa  
to, así como combinaciones apropiadas de cualesquiera porta-  
dores normales. El portador, con relación al compuesto acti-  
vo, generalmente está presente en una relación en peso de  
25:1 a 1000:1, aproximadamente.

10 El compuesto, dependiendo del portador y de la concen-  
tración que se utilice, puede o bien suspenderse o bien di-  
solverse en un vehículo estéril adecuado, prefiriéndose el  
agua. En la preparación de soluciones, el compuesto y el por-  
tador pueden disolverse en el vehículo seleccionado; la solu-  
15 ción se filtra y se añade a un frasco o ampolla adecuados, y  
el frasco o ampolla se sella. Ventajosamente, pueden disol-  
verse en el vehículo adyuvantes, tales como un preservativo  
anestésico local o un agente amortiguador. Para mejorar la  
estabilidad, el compuesto en asociación con el portador pue-  
de disolverse en agua y colocarse la solución acuosa en un  
20 frasco y luego liofilizarse. Después, el sólido liofilizado  
seco se introduce herméticamente en el frasco y se acompaña  
un frasco del vehículo suministrado para reconstituir la com-  
posición antes de su uso. Pueden prepararse suspensiones pa-  
ra administración parenteral sustancialmente del mismo modo  
25 excepto que el compuesto se suspende en el portador en vez  
de disolverse.

30 Los compuestos de fórmula I también son activos, aun-  
que no necesariamente en grado equivalente, en la inhibición  
de la liberación de la hormona del crecimiento. Este efecto  
inhibidor es beneficioso en los casos en que el huésped que

1 está siendo tratado requiere un tratamiento terapéutico por  
el exceso de secreción de somatotropina, secreción que va  
asociada a condiciones adversas tales como diabetes juvenil  
y acromegalia. Estos compuestos también ejercen otros efec-  
5 tos fisiológicos, como inhibición de la secreción de ácidos  
gástricos, útil en el tratamiento de las úlceras; inhibición  
de la secreción de exocrina por el páncreas, potencialmente  
útil en el tratamiento de la pancreatitis e inhibición de la  
secreción de insulina y glucagón. Los compuestos pueden admi-  
10 nistrarse por cualquiera de los métodos actuales, como vía  
oral, sublingual, subcutánea, intramuscular e intravenosa.  
Preferiblemente la dosis para la administración sublingual u  
oral es alrededor de 1 mg a 100 mg/kg. de peso corporal. En  
general, la dosis intravenosa, subcutánea o intramuscular pa-  
15 ra estas últimas indicaciones oscila aproximadamente entre  
1 ug y 1 mg/kg. de peso corporal y preferiblemente es alrede-  
dor de 50 a 100 ug/kg. de peso corporal. Es evidente, que  
las dosis varían entre amplios límites de acuerdo con el es-  
tado particular en tratamiento y con la gravedad de dicho es-  
20 tado.

Los compuestos de la fórmula I pueden administrarse  
oral o sublingualmente en asociación con un portador farma-  
céutico, por ejemplo, en la forma de tabletas o cápsulas.  
Pueden utilizarse diluyentes o portadores inertes, por ejem-  
25 plo, carbonato de magnesio o lactosa, junto con los agentes  
desintegradores convencionales, por ejemplo, almidón de maíz  
y ácido alginico y agentes lubricantes, por ejemplo esteara-  
to de magnesio. Típicamente, la cantidad de portador o dily-  
yente variará de aproximadamente 5 a aproximadamente 95 por  
30 ciento de la composición final y, de preferencia, de aproxi-

1 madamente 50 a aproximadamente 85 por ciento de la composi-  
ción final. También pueden emplearse agentes aromatizantes  
adecuados en la preparación final haciendo a la composición  
más agradable para su administración.

5 Cuando los compuestos de la fórmula I van a ser admi-  
nistrados parenteralmente, pueden emplearse portadores ade-  
cuados, tales como, por ejemplo, cualesquiera de aquellos  
descritos anteriormente con referencia al empleo de estos  
compuestos para relajar el músculo liso.

10 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la prepa-  
ración de los compuestos de la fórmula I y de los intermedia-  
rios para los mismos.

EJEMPLO 1

RESINA DE POLIESTIRENO METILADA DE N-t-BUTILOXICARBONIL-L-  
15 CISTEINIL(S-p-METOXIBENCILLO)

A 1000 ml. de N,N-dimetilformamida (DMF) conteniendo  
la sal de cesio de N-t-butiloxicarbonil-(S-p-metoxibencil)-  
cisteína (preparada a partir de 17.5 gramos del ácido libre)  
se agregan 100 gramos de resina de poliestireno clorometila-  
20 do (Lab Systems, Inc., 0.75 mmoles Cl/gramo). La mezcla se  
agita a temperatura ambiente durante cinco días. Luego se  
filtra la resina y se lava alternativamente tres veces, cada  
vez con una mezcla de 85 por ciento de DMF y 15 por ciento  
de agua y con DMF, y luego dos veces con DMF. A la resina  
25 suspendida en 1000 ml. de DMF se agrega una solución de 16  
gramos (83.4 mmoles) de acetato de cesio. La mezcla se agita  
durante nueve días a temperatura ambiente. Luego se filtra  
la resina y se lava alternativamente tres veces, cada vez  
con una mezcla de 85 por ciento de DMF y 15 por ciento de  
30 agua y con DMF. La resina se lava con  $\text{CHCl}_3$  y luego se sus-

1 pende cuatro veces en  $\text{CHCl}_3$  en un embudo de separación, se  
extrae el líquido cada vez para separar los trozos. La resi-  
na se filtra, se lava con etanol al 95% y luego alternativa-  
mente tres veces, cada vez con benceno y etanol al 95 por  
5 ciento. Luego la resina se seca a vacío a temperatura de 30<sup>a</sup>  
C., para obtener 115.3 gramos del producto del título. Un  
análisis de aminoácidos muestra 0.254 mmoles de Cys por gra-  
mo de resina. La cisteína se determina como ácido cisteico  
de una hidrólisis ácida que se lleva a cabo utilizando una  
10 mezcla 1:1 de dioxano y ácido clorhídrico concentrado a la  
cual se ha agregado una pequeña cantidad de sulfóxido de di-  
metilo.

EJEMPLO 2

15 RESINA DE POLIESTIRENO METILADA DE N-t-BUTILOXICARBONIL-D-  
VALIL-GLICIL-L-(S-p-METOXIBENCIL)CISTEINIL-L-(N<sup>ε</sup>-O-CLOROBEN  
CILOXICARBONIL)LISIL-L-ASPARAGINIL-L-FENILALANIL-L-FENILALA  
NIL-D-TRIPTOFIL-L-(N<sup>ε</sup>-O-CLOROBENCILOXICARBONIL)-LISIL-L-(O-  
BENCIL)TREONIL-L-FENILALANIL-L-(O-BENCIL)-TREONIL-L-(O-BEN  
CIL)SERIL-L-(S-p-METOXIBENCIL)CISTEINILO.

20 El producto del Ejemplo 1 (5.0 gramos) se coloca en  
el recipiente de reacción de un sintetizador de péptido auto  
mático Beckman 990, y se agregan doce de los trece aminoáci-  
dos restantes empleando el sintetizador automático. La resi-  
na de tridecapéptido protegida resultante se divide en dos  
25 porciones iguales, y el resto final se introduce en una de  
las porciones. Los aminoácidos que se emplean así como la se-  
cuencia de su empleo son como sigue: (1) N-t-butiloxicarbo-  
nil-(O-bencil)-L-serina; (2) N-t-butiloxicarbonil-(O-bencil)  
-L-treonina; (3) N-t-butiloxicarbonil-L-fenilalanina; (4) N-  
30 t-butiloxicarbonil-(O-bencil)-L-treonina; (5) N<sup>α</sup>-t-butiloxi-

1 carbonil-N<sup>ε</sup>-o-clorobenciloxicarbonil-L-lisina; (6) N<sup>α</sup>-t-butil  
loxicarbonil-D-triptófano; (7) N-t-butiloxicarbonil-L-fenila  
lanina; (8) N-t-butiloxicarbonil-L-fenilalanina; (9) éster  
p-nitrofenílico de N-t-butiloxicarbonil-L-asparagina; (10)  
5 N<sup>α</sup>-t-butiloxicarbonil-N<sup>ε</sup>-o-clorobenciloxicarbonil-L-lisina;  
(11) N-t-butiloxicarbonil-(S-p-metoxibencil)-L-cisteína;  
(12) N-t-butiloxicarbonil-glicina; y (13) N-t-butiloxicarbo  
nil-D-valina. La secuencia de desprotección, neutralización,  
copulación y recopulación para la introducción de cada amino  
10 ácido en el péptido es la siguiente: (1) tres lavados (10 ml  
/gramo de resina) de tres minutos cada uno con cloroformo;  
(2) separación del grupo BOC mediante tratamiento dos veces  
durante veinte minutos cada vez con 10 ml./gramo de resina  
de una mezcla de 29 por ciento de ácido trifluoroacético, 48  
15 por ciento de cloroformo, 6 por ciento de trietilsilano y 17  
por ciento de cloruro de metileno; (3) dos lavados (10 ml./  
gramo de resina) de tres minutos cada uno con cloroformo;  
(4) un lavado (10 ml./gramo de resina) de tres minutos con  
cloruro de metileno; (5) tres lavados (10 ml./gramo de resi-  
20 na) de tres minutos cada uno con una mezcla de 90 por ciento  
de alcohol t-butílico y 10 por ciento de alcohol t-amílico;  
(6) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos ca  
da uno con cloruro de metileno; (7) neutralización mediante  
tres tratamientos de tres minutos cada uno con 10 ml./gramo  
25 de resina de trietilamina en cloruro de metileno al 3 por  
ciento; (8) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres mi  
nutos cada uno con cloruro de metileno; (9) tres lavados (10  
ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con una mezcla  
de 90 por ciento de alcohol-t-butílico y 10 por ciento de al  
30 cohol t-amílico; (10) tres lavados (10 ml./gramo de resina)

1 de tres minutos cada uno con cloruro de metileno; (11) adición de 1.0 mmol/gramo de resina del aminoácido protegido y 1.0 mmol/gramo de resina de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en 10 ml./gramo de resina con cloruro de metileno seguido por mezclado durante 120 minutos; (12) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con cloruro de metileno; (13) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con una mezcla de 90 por ciento de alcohol t-butílico y 10 por ciento de alcohol t-amílico; (14) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con cloruro de metileno; (15) neutralización mediante tres tratamientos de tres minutos cada uno con 10 ml./gramo de resina de trietilamina en cloruro de metileno al 3 por ciento; (16) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con cloruro de metileno; (17) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con una mezcla de 90 por ciento de alcohol t-butílico y 10 por ciento de alcohol t-amílico; (18) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con cloruro de metileno; (19) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con DMF; (20) adición de 1.0 mmol/gramo de resina del aminoácido protegido y 1.0 mmol/gramo de resina de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en 10 ml./gramo de resina de una mezcla de 1:1 de DMF y cloruro de metileno seguido por mezclado durante 120 minutos; (21) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con DMF; (22) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con cloruro de metileno; (23) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con una mezcla de 90 por ciento de alcohol t-butílico y 10 por ciento de alcohol t-amílico; (24) tres

1 lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con  
cloruro de metileno; (25) neutralización mediante tres trata-  
mientos de tres minutos cada uno con 10 ml./gramo de resina  
de trietilamina en cloruro de metileno al 3 por ciento; (26)  
5 tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada  
uno con cloruro de metileno; (27) tres lavados (10 ml./gramo  
de resina) de tres minutos cada uno con una mezcla de 90 por  
ciento de alcohol t-butílico y 10 por ciento de alcohol t-am-  
lico; y (28) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres  
10 minutos cada uno con cloruro de metileno.

La secuencia de tratamiento anterior se emplea para  
la adición de cada uno de los aminoácidos con la excepción  
de los restos de glicina y asparagina. La adición de la gli-  
cina se lleva a cabo utilizando solamente las etapas 1-18.  
15 El resto de asparagina se incorpora por medio de su éster ac-  
tivo de p-nitrofenilo. Al hacerlo así, la etapa (11) anterior  
se modifica en la siguiente secuencia de tres etapas: (a)  
tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada  
uno con DMF; (b) adición de 1.0 mmol/gramo de resina del és-  
ter de p-nitrofenilo de N-t-butiloxicarbonil-L-asparagina en  
20 10 ml./gramo de resina de una mezcla 1:3 de DMF y cloruro de  
metileno seguido por mezclado durante 720 minutos; y (c) tres  
lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno  
con DMF. Asimismo, la etapa (20) anterior se modifica al em-  
pleo del éster de p-nitrofenilo de N-t-butiloxicarbonil-L-as-  
25 paragina en una mezcla 3:1 de DMF y cloruro de metileno se-  
guido por mezclado durante 720 minutos.

La resina de péptido terminada se seca a vacío. El  
producto se hidroliza mediante reflujo durante 72 horas en  
30 una mezcla 1:1 de ácido clorhídrico concentrado y dioxano.

1 El análisis de aminoácidos del producto resultante da los si-  
guientes resultados, empleándose la lisina como norma; Asn,  
1.00; 2Thr, 2.18; Ser, 0.95; Gly, 1.00; Val, 0.99; 3Phe,  
3.45; 2Lys, 2.00.

5

EJEMPLO 3

D-VALIL-GLICIL-L-CISTEINIL-L-LISIL-L-ASPARAGINIL-L-FENILALA-  
NIL-L-FENILALANIL-D-TRIPTOFIL-L-LISIL-L-TREONIL-L-FENILALANIL-  
L-TREONIL-L-SERIL-L-CISTEINA.

10

A una mezcla de 7.2 ml. de anisol y 7.2 ml. de mercap-  
tano de etilo se agregan 3.914 gramos (al nivel de sustitución de 0.155 mmoles/gramo) de la resina de tetradecapéptido protegida del ejemplo 2. La mezcla se enfría en nitrógeno líquido, y se agregan mediante destilación 80 ml. de fluoruro de hidrógeno líquido. La mezcla resultante se deja calentar a temperatura de 0°C., y se agita durante 2 horas. El fluoruro de hidrógeno se separa después mediante destilación. Se agrega éter a la mezcla restante y se enfría a temperatura de 0°C. El sólido resultante se recoge mediante filtración y se lava con éter. El producto se seca y el tetradecapéptido desprotegido se extrae de la mezcla de resina utilizando ácido acético 1M y ácido acético al 50%. La solución de ácido acético se liofiliza inmediatamente después hasta sequedad en la oscuridad. El sólido ligeramente amarillo resultante se suspende en una mezcla de 10 ml. de ácido acético 0.2M desgasificado y 4 ml. de ácido acético glacial. La suspensión resultante se calienta ligeramente con 6 ml. de ácido acético al 50% hasta que se obtiene como resultado una solución de color amarillo, limpia, y la solución se aplica a una columna de Sephadex G-25 F. Las condiciones cromatográficas son: disolvente, ácido acético 0.2M desgasificado; tama-

15

20

25

30

1 ño de la columna, 7.5 x 150 cm.; temperatura, 26°C.; régimen de flujo, 1670 ml./hora; volumen de la fracción, 25.05 ml.

5 El gráfico de la absorbancia a 280 m $\mu$  de cada fracción frente al número de la fracción, muestra un pico ancho y amplio seguido de un hombro. La espectroscopía UV revela que la parte principal del pico es el producto. Las fracciones que se combinan y sus volúmenes de elución son los siguientes:

10 Fracciones 207-233 (5160-5837 ml., pico = 5515 ml.)

Esta colección de fracciones no incluyen el hombro del lado posterior. La espectroscopía UV indica que hay presentes 470 mg. del producto. (Rendimiento = 46.4%). Una titulación de Ellman de una alícuota indica un contenido de sulfhidrilo libre de 95% del teórico.

15

#### EJEMPLO 4

#### OXIDACION A D-VAL<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-SOMATOSTATINA

20 La solución de la D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina reducida (677 ml.) del Ejemplo 3 se diluye con agua destilada para obtener una concentración de 50  $\mu$ g./mg. Se agrega hidróxido de amonio concentrado para ajustar el pH de la mezcla a 6.7. La solución se agita a temperatura de 49°C., en la oscuridad durante 64 horas, después de lo cual una titulación de Ellman indica que la oxidación está completa.

25

La mezcla se concentra a vacío hasta un volumen de 45 ml., y se agregan 45 ml. de ácido acético glacial. La mezcla luego se desala en una columna de Sephadex G-25 F. Las condiciones cromatográficas son las siguientes: disolvente, ácido acético gl. 50% desgasificado; tamaño de la columna, 5.0 x 215 cm.; temperatura, 26°C.; régimen de flujo, 148 ml/hora; volumen de la fracción, 17.3 ml.

30

1 El gráfico de la absorbancia a 280 m $\mu$  de cada fracción frente al número de la fracción muestra dos picos grandes. El primer-pico representa las formas agregadas del producto y el segundo pico representa el producto monomérico.

5 El material representado por el segundo pico se recoge (fracciones 116-155 (2000-2685 ml.)). La espectroscopía UV indica que hay presentes 279 mg. de producto en la muestra (rendimiento = 59.4%). La solución se liofiliza hasta sequedad en la oscuridad.

10 El sólido blanco resultante se vuelve a cromatografiar en dos porciones aproximadamente iguales. La primera porción se disuelve en 25 ml. de ácido acético al 50% desgasificado y se absorbe en una columna de Sephadex G-25 F. Las condiciones cromatográficas son: disolvente, ácido acético  
15 al 50% desgasificado; tamaño de la columna, 5.0 x 215 cm.; temperatura, 26°C.; régimen de flujo, 148 ml./hora; volumen de la fracción, 17.3 ml.

20 El gráfico de la absorbancia a 280 m $\mu$  de cada fracción frente al número de la fracción muestra dos picos grandes. Se hace un corte conservador del segundo pico. Se combinan las fracciones 119 a 125 (volúmenes de efluente de 2128-2256 ml.). La espectroscopía UV indica que hay presentes  
25 65.5 mg. de producto en esta muestra. La solución se liofiliza hasta sequedad en la oscuridad para obtener el producto deseado.

30 La segunda porción se vuelve a cromatografiar de la misma manera que la primera con resultados similares. Los dos productos buenos se combinan haciendo un total de 126 mg. mediante espectroscopía UV (recuperación de 45.2% de producto purificado). El producto combinado se disuelve en 15 ml.

1 de ácido acético 0.2M desgasificado y se aplica a una colum-  
na de Sephadex G-25 F. Las condiciones cromatográficas son:  
disolvente, ácido acético 0.2M desgasificado; tamaño de la  
columna, 5.0 x 150 cm.; temperatura, 26°C.; régimen de flujo  
5 466 ml./hora; volumen de la fracción, 16.3 ml.

El gráfico de la absorbancia a 280 mμ de cada frac-  
ción frente al número de la fracción muestra un pico grande.  
La espectroscopía UV indica que la porción principal del pi-  
co es un producto excelente. Las fracciones 160-180 (2592-  
10 2934 ml., pico = 2685 ml.) se combinan y se liofilizan hasta  
sequedad en la oscuridad. La espectroscopía UV indica la pre-  
sencia de 90.4 mg. de producto (71.7% de recuperación).

Rotación óptica  $[\alpha]_D^{26} = -56.1^{\circ}$  (ácido acético al 1%).

15 Análisis de aminoácidos: Val, 1.0; Gly, 0.97; 2Cys,  
1.62; 2Lys, 2.00; Asn, 1.01; 3Phe, 2.87; Trp, 1.02; 2Thr,  
1.83; Ser, 0.81.

Los resultados anteriores se expresan como relaciones  
de Lys/2 = 1.0. Todos los valores son promedios de dos hidró-  
lisis de 21 horas sin eliminadores. El triptófano se determi-  
20 na de espectroscopía UV (como una relación a Lys/2); la seri-  
na no está corregida por las pérdidas durante la hidrólisis.

El producto anterior contiene cantidades menores de  
impurezas. Si se desea, el producto puede purificarse adi-  
cionalmente sometiéndolo a cromatografía preparativa de lí-  
25 quido a presión elevada (HPLC).

Un método alternativo para oxidar a la D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>  
-somatostatina reducida a D-Val, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina es me-  
diante tratamiento con ferricianuro de potasio. La oxidación  
se lleva a cabo en una solución acuosa a un pH de 6.7 como  
30 se describe anteriormente en este ejemplo. Se agrega a la

1 mezcla una solución acuosa de ferricianuro de potasio para  
producir una concentración final que representa aproximada-  
mente 3.3 veces aquella de la D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina  
reducida. La solución se agita en la oscuridad a temperatura  
5 ambiente durante aproximadamente dos horas. La terminación  
de la oxidación se verifica mediante titulación de Ellmen.

EJEMPLO 5

RESINA DE POLIESTIRENO METILADA DE N-t-BUTILOXCARBONIL-D-  
ALANIL-GLICIL-L-(S-p-METOXI BENCIL)-CISTEINIL-L-(N<sup>ε</sup>-o-CLORO  
10 BENCILOXI CARBONIL)LISIL-L-ASPARAGINIL-L-FENILALANIL-L-FENI  
LALANIL-D-TRIPTOFIL-L-(N<sup>ε</sup>-o-CLOROBENCILOXICARBONIL)LISIL-L  
(O-BENCIL)TREONIL-L-FENILALANIL-L-(O-BENCIL)TREONIL-L-(O-  
BENCIL)SERIL-L-(S-p-METOXI BENCIL)CISTEINILO.

15 Este compuesto se prepara utilizando la segunda por-  
ción del tridecapéptido que se prepara en en Ejemplo 2 y co-  
pulando N-t-butiloxicarbonil-D-alanina con ella en lugar de  
la N-t-butiloxicarbonil-D-valina.

El análisis de aminoácidos del producto resultante  
después de la hidrólisis mediante reflujo durante 21 horas  
20 en una mezcla 1:1 de ácido clorhídrico concentrado y dioxano  
da los siguientes resultados, empleándose la lisina como nor-  
ma: Asn, 1.16; 2Thr, 2.14; Ser, 1.04; Gly, 1.09; Ala, 1.17;  
3Phe, 2.88; 2Lys, 2.00.

EJEMPLO 6

25 D-ALANIL-GLICIL-L-CISTEINIL-L-LISIL-L-ASPARAGINIL-L-FENILALA  
NIL-L-FENILALANIL-D-TRIPTOFIL-L-LISIL-L-TREONIL-L-FENILALANIL  
-L-TREONIL-L-SERIL-L-CISTEINA-

El compuesto del título se prepara de acuerdo con el  
método del Ejemplo 3 utilizando 3.772 gramos (en el nivel de  
30 sustitución de 0.156 mmoles/gramo) del producto del Ejemplo

1 5. La purificación del producto se lleva a cabo mediante cro-  
matografía sobre una columna de Sephadex G-25 F. Las condi-  
ciones cromatográficas son: disolvente, ácido acético 0.2M  
5 desgasificado; tamaño de la columna, 7.5 x 150 cm.; tempera-  
tura, 26°C.; régimen de flujo, 1658 ml./hora; volumen de la  
fracción, 24.87 ml.

El gráfico de la absorbancia a 280 mμ de cada una de  
las fracciones frente al número de la fracción muestra un pi-  
co grande y amplio seguido de un hombro. La espectroscopía  
10 UV muestra que la parte principal del pico representa al pro-  
ducto.

Las fracciones que se combinan y sus volúmenes de elu-  
ción son los siguientes:

Fracciones 206-230 (5098-5720 ml.).

15 Esta colección de fracciones no incluye el hombro pos-  
terior. La espectroscopía UV indica que está presente en la  
muestra una cantidad teórica de 403.9 mg. (rendimiento =  
41.9%). Una titulación de Ellman de una alícuota indica un  
contenido de sulfhidrilo libre de 93% del teórico.

20

#### EJEMPLO 7

#### OXIDACION A D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-SOMATOSTATINA

La D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina reducida del Ejemplo  
6 se trata de acuerdo con el método del Ejemplo 4. La solu-  
ción (622 ml.; teóricamente 403.9 mg.) se diluye con agua  
25 destilada para obtener una concentración de 50 μg/ml. y lue-  
go se ajusta a un pH de 6.7 con hidróxido de amonio concen-  
trado. La mezcla se agita a temperatura ambiente en la oscu-  
ridad durante 41 horas. La mezcla se concentra a vacío hasta  
aproximadamente 40 ml. y luego se diluye con 40 ml. de ácido  
30 acético glacial. La mezcla se absorbe después sobre una co-

1 lumna de Sephadex G-25 F. Las condiciones cromatográficas  
son las siguientes: disolvente, ácido acético al 50% desgasifi-  
5 cado; tamaño de la columna, 5.0 x 215 cm.; temperatura,  
26°C.; régimen de flujo, 151 ml./hora; volúmen de la frac-  
ción, 17.61 ml.

El gráfico de la absorbancia a 280 m $\mu$  para cada frac-  
ción frente al número de la fracción muestra dos picos gran-  
des y amplios. El primer pico representa las formas agrega-  
das del producto y el segundo pico representa el producto mo-  
10 nomérico bueno. El producto representado por el segundo pico  
[Fracciones 113-155 (1971-2728 ml.)] se recoge y se liofiliza  
hasta sequedad en la oscuridad. El sólido resultante se  
vuelve a cromatografiar en aproximadamente dos porciones  
iguales. La primera porción se disuelve en 22 ml. de ácido  
15 acético M al 50% desgasificado y la solución se aplica a una  
columna de Sephadex G-25 F. Las condiciones cromatográficas  
son: disolvente, ácido acético al 50% desgasificado; tamaño  
de la columna, 5.0 x 215 cm.; temperatura, 26°C.; régimen de  
flujo, 153 ml./hora; volúmen de la fracción, 17.85 ml.

20 El gráfico de la absorbancia a 280 m $\mu$  para cada frac-  
ción frente al número de la fracción muestra dos picos gran-  
des. Se hace un corte conservador del segundo pico combinan-  
do las Fracciones 121-127 (volúmenes de efluente de 2142-  
2267 ml.). La espectroscopía UV indica la presencia de 56.7  
25 mg. de producto en esta muestra. La solución se liofiliza  
hasta sequedad en la oscuridad para obtener el producto dese-  
do.

La segunda porción se vuelve a cromatografiar de la  
misma manera que la primera. Los productos se combinan (126.5  
30 mg. mediante espectroscopía UV -- 31.3% de rendimiento de la

1 forma reducida). El producto se disuelve en 21 ml. de ácido  
acético 0.2M desgasificado y se aplica a una columna de Se-  
phadex G-25 F. Las condiciones cromatográficas son: disolven-  
te, ácido acético 0.2M desgasificado; tamaño de la columna,  
5 5.0 x 150 cm.; temperatura, 26°C.; régimen de flujo, 449 ml/  
hora; volumen de la fracción, 15.71 ml.

El gráfico de la absorbancia a 280 mμ de cada frac-  
ción frente al número de la fracción muestra un pico grande.  
La espectroscopía UV indica que la porción principal del pi-  
co es el producto. Las fracciones 169-188 (2640-2953 ml., pi-  
10 có = 2705 ml.) se combinan y se liofilizan hasta sequedad en  
la oscuridad. La espectroscopía UV indica la presencia de  
85.2 mg. de producto (67.5% de recuperación).

Rotación óptica  $[\alpha]_D^{26} = -54.9^\circ$  (ácido acético al 1%).

15 Análisis de aminoácidos: Ala, 1.05; Gly, 1.0; 2Cys,  
1.58; 2Lys, 2.0; Asn, 1.10; 3Phe, 2.92; Trp, 1.02; 2Thr, 1.98;  
Ser, 0.88.

Los resultados anteriores se expresan como relaciones  
a Lys/2 = 1.0. Todos los valores son promedios de dos hidró-  
20 lisis de 21 horas sin eliminadores. El triptófano se determi-  
na en espectroscopía UV ( como una relación a Lys/2); la se-  
rina no está corregida por las pérdidas durante la hidrólisis.

La D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina se prueba en perros  
con respecto a su inhibición in vivo de la secreción de áci-  
do gástrico. En seis perros con fístula crónica y bolsa de  
25 Feidenhain, se induce la secreción de HCl gástrico mediante  
la infusión del tetrapéptido con C-terminal de gastrina a  
0.5 μg./kg.-hora. Cada perro sirve como su propio control.  
Después de una hora de secreción de estado estable de HCl,  
30 se administra por infusión la D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina a

1 0.15 ug./kg.-hora durante una hora. La colección de muestras  
de ácido gástrico se continúa durante 1.5 horas adicionales  
a intervalos de 15 minutos. Las muestras se titulan a un pH  
de 7 con un titulador automático. El efecto inhibitorio máxi  
5 mo de la D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina es extrapolado contra  
la curva de dosis-respuesta de la somatostatina, y la poten-  
cia relativa del análogo con respecto a aquella de la soma-  
tostatina se expresa como porcentaje de actividad. La D-Val<sup>1</sup>,  
D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina inhibe la secreción de ácido de estado  
10 estable inducida por el tetrapéptido C-terminal de gastrina  
en  $48.22 \pm 6.45\%$  (error típico de promedio). Este efecto es  
equivalente a aquel de 0.175 ug./kg.-hora de somatostatina.  
Su actividad con relación a la de la somatostatina, por lo  
tanto, es de 116%. Una muestra sumamente más purificada de  
15 D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina administrada a dosis de 0.200,  
0.166 y 0.138 ug./kg.-hora inhibe la secreción de ácido de  
estado estable inducida por el tetrapéptido C-terminal de  
gastrina en 77.63, 71.57 y 67.8%, respectivamente. Esta acti-  
vidad con relación a la de la somatostatina es de 302-325%.

20 La D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina, probada a 0.20 ug./  
kg.-hora en las mismas condiciones inhibe la secreción de  
ácido de estado estable inducida por el tetrapéptido C-termi-  
nal de gastrina en  $73.61 \pm 3.66\%$  (error típico en promedio).  
Este efecto es equivalente a aquel de 0.550 ug./kg.-hora de  
25 somatostatina. Su actividad con relación a la de la somatos-  
tatina por lo tanto es de 275%.

30 La D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina y la D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-  
somatostatina también se prueban con respecto a su acción so-  
bre la movilidad de los intestinos en perros conscientes. Se  
utilizan tres perros que tienen sondas intralumenales coloca

1 das en el antro, duodeno y píloro. Los cambios de presión en  
el lumen del intestino se registran en un Visicorder utili-  
zando extensímetros y galvanómetros de haz luminoso en minia-  
tura. Después de que se establece un control de estado esta-  
5 ble, el compuesto de prueba se administra mediante infusión  
por vía intravenosa durante un periodo de diez minutos. El  
compuesto de prueba inicialmente incrementa la presión intra-  
lumenal en el píloro y luego la disminuye mientras la pre-  
sión en el duodeno y el antro permanece rebajada durante la  
10 prueba. La dosis efectiva mínima requerida para incrementar  
la presión del píloro y para disminuir las presiones del duo-  
deno y el antro es de aproximadamente 0.05 µg./kg.-10 minu-  
tos para la D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina y de aproximadamen-  
te 0.1 µg./kg.-10 minutos para la D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostati-  
15 na. Esta se compara con un valor para la somatostatina misma  
de 0.125-0.25 µg./kg.-10 minutos.

La D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina y la D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-  
somatostatina también se prueban con relación a su actividad  
con respecto a la liberación de la hormona del crecimiento.  
20 El procedimiento que se emplea se lleva a cabo utilizando ra-  
tas macho normales de la raza Sprague-Dawley que pesan de  
100 a 120 gramos (Laboratory Supply Company, Indianapolis,  
Indiana, E.U.A.). La prueba es una modificación del método  
de P. Brazeau, W. Vale y R. Guilleman, Endocrinology, 94 184  
25 (1974). En esta prueba, se emplea un total de cinco grupos  
de ocho ratas cada uno para probar cada uno de los compues-  
tos. Se administra intraperitonealmente pentobarbital sódico  
a todas las ratas para estimular la secreción de la hormona  
del crecimiento. Un grupo sirve como el control y recibe só-  
30 lamente solución salina. Dos de los grupos reciben somatosta

1 tina, uno a 2  $\mu\text{g.}/\text{rata}$ , por la vía subcutánea, y el otro a  
50  $\mu\text{g.}/\text{rata}$ , subcutáneamente. Los otros dos grupos reciben  
el compuesto de prueba, uno a 10  $\mu\text{g.}/\text{rata}$ , subcutáneamente,  
y el otro a 0.4  $\mu\text{g.}/\text{rata}$ , subcutáneamente. La concentración  
5 del suero de la hormona de crecimiento se mide 20 minutos  
después de la administración simultánea del pentobarbital só-  
dico y del compuesto de prueba. Luego se determina el grado  
de inhibición de la concentración de suero de la hormona de  
crecimiento con respecto al grupo de control, y se comparan  
10 las actividades relativas del compuesto de prueba y de la so-  
matostatina misma.

A niveles de dosis de 0.4  $\mu\text{g.}/\text{rata}$  y de 10  $\mu\text{g.}/\text{rata}$ ,  
la D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina inhibe el incremento en la  
secreción de la hormona de crecimiento en 14% y en 42% sobre  
15 el control, respectivamente. La somatostatina, a un nivel de  
dosis de 2  $\mu\text{g.}/\text{rata}$  no tiene efecto sobre el incremento en  
la secreción de la hormona de crecimiento mientras que a 50  
 $\mu\text{g.}/\text{rata}$  inhibe el incremento en la secreción de la hormona  
de crecimiento en 56% sobre el control.

20 A niveles de dosis de 0.4  $\mu\text{g.}/\text{rata}$  y de 10  $\mu\text{g.}/\text{rata}$ ,  
la D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina inhibe el incremento en la  
secreción de la hormona de crecimiento en 54% y en 91% sobre  
el control, respectivamente. La somatostatina, a niveles de  
dosis de 2  $\mu\text{g.}/\text{rata}$  y de 50  $\mu\text{g.}/\text{rata}$  inhibe el incremento en  
25 la secreción de la hormona del crecimiento en 40% y en 87%  
sobre el control, respectivamente.

La D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina y la D-Ala<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-  
somatostatina también se prueban con respecto a su actividad  
30 in vivo en la inhibición de la secreción de glucagon y de in-  
sulina a la estimulación con L-alanina. Perros normales de

1 raza indefinida de cualquier sexo se ponen en ayuno durante  
la noche. Se obtienen muestras de sangre de control y luego  
se empieza una infusión intravenosa de solución salina, soma  
5 tostatina, o del compuesto de prueba. Después de 30 minutos,  
se administra adicionalmente por la vía intravenosa L-alani-  
na durante un periodo de 15 minutos. La infusión de solución  
salina, somatostatina o del compuesto de prueba se continúa  
durante 15 minutos después de completarse la infusión de L-  
alanina. La infusión de L-alanina ocasiona un incremento  
10 brusco en la concentración de glucagon y de insulina en el  
suero que regresa a la concentración de control al terminar-  
se la infusión de L-alanina. De lo anterior se determina que  
la dosis mínima de D-Val<sup>1</sup>, D-Trp<sup>8</sup>-somatostatina para la inhi-  
bición de la secreción de glucagon es de 0.04 a 0.11 µg./kg/  
15 minuto y para la inhibición de la secreción de insulina es  
menor de 0.004 µg./kg/minuto. La dosis mínima de D-Ala<sup>1</sup>, D-  
Trp<sup>8</sup>-somatostatina para la inhibición de la secreción tanto  
de glucagon como de insulina es menor de 0.03 µg./kg./minu-  
to/.

20 En resumen, la Patente de Invención que se solicita,  
deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para la preparación de nuevos de-  
rivados de somatostatina de fórmula (I)

25 Y-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-D-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-  
L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH, de la fórmula I, en donde Y es D-Val ó  
D-Ala; y las sales de adición de ácido no tóxicas farmaceu-  
ticamente aceptables del mismo, cuyo procedimiento consiste  
en hacer reaccionar un compuesto de fórmula:

30 R-Y-Gly-L-Cys(R<sub>1</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-

*RG*

1 (R<sub>5</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Phe-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Ser(R<sub>4</sub>)-L-Cys(R<sub>1</sub>)

-X, de la fórmula II, en donde

Y es D-Val ó D-Ala;

R es hidrógeno o un grupo protector de α-amino;

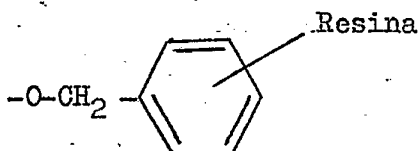
5 R<sub>1</sub> es hidrógeno o un grupo protector de tio;

R<sub>2</sub> es hidrógeno o un grupo protector de ε-amino;

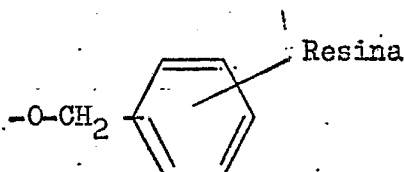
R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> cada una son hidrógeno o un grupo protector de hidroxil;

R<sub>5</sub> es hidrógeno o formilo; y

10 X es hidroxil o



15 en donde la resina es poliestireno; con la condición de que, cuando X es hidroxil, cada una de R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> es hidrógeno y, cuando X es



20 cada una de R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es diferente de hidrógeno, con un agente de oxidación y; en el caso en que X sea



25 30 someter a reacción de eliminación de los grupos protectores

1 antes de efectuar la reacción de oxidación.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde Y es D-Val.

3.- Un procedimiento según la reivindicación 2, en donde el agente de oxidación es aire.

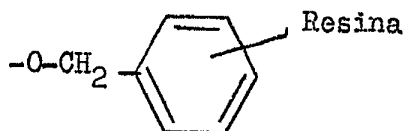
4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde Y es D-Ala.

5.- Un procedimiento según la reivindicación 3, en donde el agente oxidante es aire.

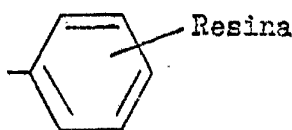
6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, donde el compuesto de partida tiene la fórmula R-D-Val-Gly-L-Cys(R<sub>1</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp(R<sub>5</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Phe-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Ser(R<sub>4</sub>)-L-Cyx(R<sub>1</sub>)-X.

7.- Un procedimiento según la reivindicación 6, donde X es hidroxilo.

8.- Un procedimiento según la reivindicación 6, donde X es



9.- Un procedimiento según la reivindicación 8, donde el compuesto de partida tiene la fórmula N-(BOC)-D-Val-Gly-L-(PMB)-Cys-L-(CBzOC)-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-(CBzOC)-Lys-L-(Bzl)Thr-L-Phe-L-(Bzl)Thr-L-(Bzl)Ser-L-(PMB)Cys-O-CH<sub>2</sub>-



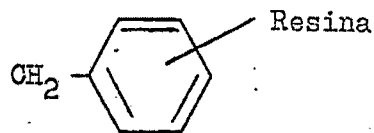
1 10.- Un procedimiento según la reivindicación 1 donde el compuesto de partida tiene la fórmula R-D-Ala-Gly-L-Cys (R<sub>1</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp(R<sub>5</sub>)-L-Lys(R<sub>2</sub>)-L-Thr (R<sub>3</sub>)-L-Phe-L-Thr(R<sub>3</sub>)-L-Ser(R<sub>4</sub>)-L-Cys-(R<sub>1</sub>)-X.

3 11.- Un procedimiento según la reivindicación 10, donde X es hidroxilo.

12.- Un procedimiento según la reivindicación 10, donde X es



13.- Un procedimiento según la reivindicación 12, donde el compuesto de partida tiene la fórmula N-(BOC)-D-Ala-Gly-L-(PMB)Cys-L-(CBzOC)-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-D-Trp-L-(CbzOC)Lys-L-(Bzl)Thr-L-Phe-L-(Bzl)Thr-L-(Bzl)Ser-L-(PMB)Cys-O-




25 14.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención por: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS DERIVADOS DE SOMATOSTATINA"

1

Todo conforme queda descrito y reivindicado en la presente Memoria descriptiva que consta de treinta y nueve páginas mecanografiadas.

5

Madrid, 20 de abril de 1.978  
BERNARDO UNGRIA  
P.P.



10

15

20

25

30

