



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	NUMERO	10	A 1
21	469.005		
22	FECHA DE PRESENTACION		
	20-4-1978		

PATENTE DE INVENCION

30	PRIORIDADES:	32	FECHA	33	PAIS
31	NUMERO				
	789.472		21-4-1977		Estados Unidos

47	FECHA DE PUBLICIDAD	51	CLASIFICACION INTERNACIONAL	63	PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
			C07C JAG1K		

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

71	SOLICITANTE (S)
ELI LILLY AND COMPANY	

DOMICILIO DEL SOLICITANTE	
307 East McCarty Street, INDIANAPOLIS, Indiana, Estados Unidos	

72	INVENTOR (ES)
James Edwin Shields, de nacionalidad estadounidense, el cual ha cedido sus derechos a la entidad solicitante	

73	TITULAR (ES)
El mismo solicitante	

74	REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU	

1 Esta invención se refiere a un procedimiento para pre-
parar el tetradecapéptido D-Val-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, fórmula
5 I, así como también sus sales de adición de ácido farmacéuti-
camente aceptables y a intermediarios producidos mediante la
síntesis del tetradecapéptido.

 La somatostatina (también conocida como el factor que
inhibe la liberación de la somatotropina) es un tetradecapép-
tido de la fórmula L-Ala-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-
10 L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Cys-OH. Este tetradeca-
péptido se aisló de los extractos hipotalámicos de ovinos y
se encontró que era activo para inhibir la secreción de la
hormona del desarrollo (HG), también conocida como somatotro-
pina. A este respecto, ver P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus,
15 N. Ling, M. Butcher, J. Rivier, y R. Guillemin, Science 179,
77 (1973).

 Además, la Patente de los Estados Unidos 3,904,594
describe la somatostatina natural así como también una clase
genérica de otros compuestos que tienen la secuencia de dode-
20 capéptido representado por las posiciones 3-14 de la hormona
natural.

 Además, el compuesto convenientemente designado como
D-Ala¹-somatostatina fue dado a conocer previamente en Fer-
land y otros, Molecular and Cellular Endocrinology, 4, 79-88
25 (1976). La D-Ala¹-somatostatina, aunque estructuralmente es
un estereoisómero de la L-Ala¹-somatostatina natural, es
aproximadamente la mitad de activa que la somatostatina natu-
ral en la inhibición in vivo de la secreción del ácido gá-
strico. El compuesto de esta invención la D-Val¹-somatostati-
30 na, difiere de la D-Ala¹-somatostatina por la sustitución de

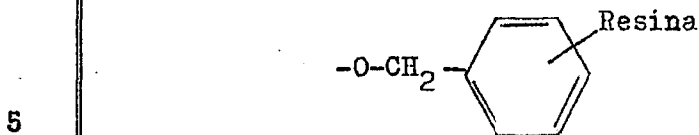
1 dos hidrógenos por grupos metilo. Si se pudiera esperar algo
con respecto a la actividad farmacológica de la D-Val¹-soma-
tostatina, sería que su actividad fuera similar a aquella de
la D-Ala¹-somatostatina; de esta manera sería menos activa
5 que la hormona natural como un inhibidor in vivo de la secre-
ción del ácido gástrico. Sin embargo, la D-Val¹-somatostati-
na exhibe una actividad que es un poco mayor que la hormona
natural. Este resultado es lo que demuestra la impredecibili-
dad de la D-Val¹-somatostatina cuando se compara a compues-
10 tos estructuralmente similares de la técnica anterior.

El tetradecapéptido biológicamente activo de la fórmula
la I definido anteriormente, incluye las sales de adición de
ácido no tóxicas del mismo. Su estructura difiere de aquella
de la somatostatina por la presencia de un residuo de D-vali-
15 na en la posición 1, en lugar de un residuo de L-alanina.
Por conveniencia, el tetradecapéptido de la fórmula I, puede
referirse como D-Val¹-somatostatina.

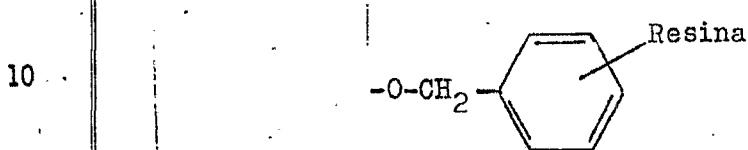
De esta manera, esta invención se refiere a un proce-
dimiento para preparar un compuesto seleccionado de aquellos
20 de la fórmula H-D-Val-Gly-L-Cys-L-Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-
Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-Gys-OH y sus sales de
adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables, y
como intermediario, R-D-Val-Gly-L-Cys-(R₁)-L-Lys-(R₂)-L-Asn-
L-Phe-L-Phe-L-Trp(R₅)-L-Lys-(R₂)-L-Thr(R₃)-L-Phe-L-Thr(R₃)-L-
25 Ser(R₄)-L-Cys(R₁)-X, fórmula II; en donde

R es hidrógeno o un grupo de protección de α-amino;
R₁ es hidrógeno o un grupo de protección de tio;
R₂ es hidrógeno o un grupo de protección de ε-amino;
R₃ y R₄ cada uno son hidrógeno o un grupo de protec-
30 ción de hidroxilo;

1 R_5 es hidrógeno o formilo; y
X es hidroxilo



en donde la resina es poliestireno; con la condición de que, cuando X es hidroxilo, cada uno de R, R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ es hidrógeno, y cuando X es



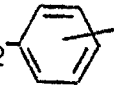
cada uno de R, R₁, R₂, R₃ y R₄ es diferente de hidrógeno.

15 El tetradecapéptido nuevo de fórmula I, el D-Val-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, se prepara haciendo reaccionar el tetradecapéptido de cadena lineal correspondiente de fórmula III, el H-D-Val-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, con un agente de oxidación. Esta reacción convierte los dos grupos sulfhidrilo a un puente de disulfuro.

20 Las sales de ácido no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales de adición de ácido orgánicos o inorgánicos, por ejemplo aquellas preparadas de ácido clorhídrico, sulfúrico, sulfónico, tartárico, fumárico, bromhídrico, glicólico, cítrico, maléico, fosfórico, succínico, acético, nítrico, benzóico, ascórbico, p-toluensulfónico, bencensulfónico, naftalensulfónico, y propiónico. Preferiblemente, las sales de adición de ácido son aquellas preparadas de ácido acético. Cualquiera de las sales anteriores se preparan, 25
30 mediante métodos convencionales.

1 También contempladas dentro del alcance de esta inven-
ción se encuentran los intermediarios de la fórmula II, el
R-D-Val-Gly-L-Cys(R₁)-L-Lys(R₂)-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp(R₅)-
L-Lys-(R₂)-L-Thr(R₃)-L-Phe-L-Thr(R₃)-L-Ser(R₄)-L-Cys(R₁)-X.

5 Incluyen intermediarios preferidos: el
H-D-Val-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, fórmula III; y el

10 N-(BOC)-D-Val-Gly-L-(PMB)Cys-L-(CBzOC)-
Lys-L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-(For)Trp-L-(CBzOC)-
Lys-L-(Bzl)Thr-L-Phe-L-(Bzl)Thr-L-(Bzl)-
Ser-L-(PMB)Cys-O-CH₂- Resina

15 Las fórmulas anteriores que definen los intermedia-
rios incluyen grupos de protección para las funciones amino,
hidroxi y tio (sulfhídrido). Las propiedades de un grupo de
protección, como se definen en la presente, son dobles. En
primer lugar, el grupo de protección evita que una porción
20 reactiva presente en una molécula particular sufra reacción
durante el sometimiento de la molécula a condiciones que po-
drían provocar la ruptura de la porción de otra manera acti-
va. En segundo lugar, el grupo de protección es tal que pue-
de separarse fácilmente con la restauración de la porción ac-
tiva original y bajo condiciones que no afectarían indesea-
blemente a otras porciones de la molécula. Los grupos que
25 son útiles para estos propósitos, esto es, para proteger los
grupos amino, hidroxi y tio, son bien conocidos por aquellos
expertos en la técnica. Realmente, se han editado volúmenes
completos específicamente a una descripción y discusión de
los métodos para utilizar tales grupos. Uno de tales volúme-
30 nes es el tratado, Protective Groups in Organic Chemistry,

1 J. F.W. McOmie, Editor, Plenum Press, Nueva York, 1973.

5 En las fórmulas anteriores que definen los intermedia-
rios R representa ya sea un hidrógeno de α -amino o un grupo
de protección de α -amino. Los grupos de protección de α -ami-
no considerados para R son bien conocidos por aquellos con
10 experiencia ordinaria en la técnica de los péptidos. Muchos
de estos se detallan en McOmie, anteriormente citado, Capítu-
lo 2, escrito por J.W. Barton. Son ilustrativos de tales gru-
pos de protección, el benciloxicarbonilo, el p-clorobencilo-
xicarbonilo, el p-bromobenciloxicarbonilo, el o-clorobencilo-
xicarbonilo, el 2,6-diclorobenciloxicarbonilo, el 2,4-diclo-
robenciloxicarbonilo, el o-bromobenciloxicarbonilo, el p-me-
toxibenciloxicarbonilo, el p-nitrobenciloxicarbonilo, el t-
butiloxicarbonilo (BOC), el t-amiloxicarbonilo, el 2-(p-bife-
15 nilil)isopropiloxicarbonilo (BpOC), el adamantiloxicarbonilo,
el isopropiloxicarbonilo, el ciclopentiloxicarbonilo, el ci-
clohexiloxicarbonilo, el cicloheptiloxicarbonilo, el trife-
nilmetilo (trilito), y el p-toluensulfonilo. Preferiblemente,
el grupo de protección de α -amino definido por R es el t-bu-
20 tiloxicarbonilo.

R¹ representa ya sea el hidrógeno del grupo sulfhidri-
lo de la cisteína o un grupo de protección para el sustit-
yente sulfhidrilo. Muchos de tales grupos de protección son
descritos por McOmie, anteriormente mencionado, capítulo 7,
25 escrito por R. G. Hickey, V.R. Razo, y W.G. Rhodes. Son ilus-
trativos, de tales grupos de protección adecuados, el p-meto-
xibencilo, el bencilo, el p-totilo, el benzhidrilo, el aceta-
midometilo, el trilito, el p-nitrobencilo, el t-butilo, el
isobutiloximetilo, así como también cualesquiera de un núme-
30 ro de derivados de trilito. Para grupos adicionales ver, por

1 ejemplo, Houben-Weyl, Methodes der Organischen Chemie,
"Synthese von Peptiden", Volúmenes 15/1 y 15/2, (1974),
Stuttgart, Alemania. Preferiblemente, el grupo de protección
de sulfhidrilo definido por R_1 es p-metoxibencilo.

5 R_2 representa ya sea hidrógeno sobre la función ϵ -amino del residuo de lisina o un grupo de protección ϵ -amino adecuado. Son ilustrativos de tales grupos la totalidad de aquellos mencionados en la presente con anterioridad que son adecuados para emplearse como un grupo de protección de α -amino. Incluidos como típicos de tales grupos se encuentran el benciloxicarbonilo, el t-butiloxicarbonilo, el t-amiloxicarbonilo, el ciclo-pentiloxicarbonilo, el adamantiloxicarbonilo, el p-metoxibenciloxicarbonilo, el p-clorobenciloxicarbonilo, el p-bromobenciloxicarbonilo, el o-clorobenciloxicarbonilo, el 2,6-diclorobenciloxicarbonilo, el 2,4-diclorobenciloxicarbonilo, el o-bromobenciloxicarbonilo, el p-nitrobenciloxicarbonilo, el isopropiloxicarbonilo, el ciclohexiloxicarbonilo, el cicloheptiloxicarbonilo y el p-toluensulfonilo.

15
20 Como será evidente más adelante, el procedimiento para la preparación de los tetradecapéptidos de fórmula I, involucra la disociación periódica del grupo de protección de α -amino desde el amino-ácido terminal presente en la cadena del péptido. De esta manera, la única limitación con respecto a la identidad del grupo de protección de ϵ -amino en el residuo de lisina es que este sea tal que no se disociará bajo las condiciones empleadas para disociar selectivamente el grupo de protección de α -amino. La selección apropiada de los grupos de protección de α -amino y ϵ -amino es un asunto que queda dentro del conocimiento de un químico relacionado con los péptidos de experiencia ordinaria en el ramo y de-

25
30

1 pende de la facilidad relativa con la cual pueda disociarse
un grupo de protección particular. De esta manera, los gru-
pos tales como el 2-(p-bifenilil)isopropiloxicarbonilo (BpCC)
y tritilo son muy lábiles y pueden ser disociados aún en pre-
5 sencia de un ácido moderado. Se requiere de un ácido modera-
damente fuerte, tal como el ácido clorhídrico, el ácido tri-
fluoroacético o el trifluoruro de boro en ácido acético, pa-
ra disociar otros grupos tales como el t-butoxicarbonilo, el
t-amiloxicarbonilo, el adamantiloxicarbonilo y el p-metoxiben-
10 ciloxicarbonilo. Se requieren de condiciones ácidas aún más
fuertes para efectuar la disociación de otros grupos de pro-
tección tales como el benciloxicarbonilo, el halogenobencilo-
xicarbonilo, el p-nitrobenciloxicarbonilo, el cicloalquiloxi-
carbonilo y el isopropiloxicarbonilo. La disociación de es-
15 tos últimos grupos requiere de condiciones ácidas drásticas
tales como el empleo de ácido bromhídrico, ácido fluorhídri-
co o trifluoroacetato de boro en ácido trifluoroacético. Por
supuesto, cualquiera de los grupos más lábiles se disociará
también bajo las condiciones ácidas más fuertes. La selec-
20 ción apropiada de los grupos de protección de amino de esta
manera incluirá el empleo de un grupo en la función α -amino
que es más lábil que aquel empleado como el grupo de protec-
ción de ϵ -amino con las condiciones de disociación diseñadas
para separar selectivamente únicamente la función α -amino.

25 En este contexto, R_2 preferiblemente es o-clorobenciloxicar-
bonilo o ciclopentiloxicarbonilo y, conjuntamente con él, el
grupo de protección de α -amino escogido para emplearse en ca-
da uno de los aminoácidos que se agregan a la cadena de pép-
tido, preferiblemente es el t-butiloxicarbonilo.

30

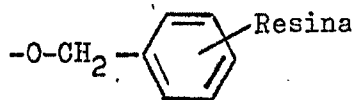
Los grupos R_3 y R_4 representan el hidrógeno del hidro

1 xilo 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, anteriormente
citado, Capítulo 3, escrito por C.B. Reese. Son típicos de
5 tales grupos de protección, por ejemplo, alquilo de C_1-C_4 ,
tales como metilo, etilo, y t-butilo; bencilo; bencilo susti-
tuido, tal como p-metoxibencilo, p-nitrobencilo, p-cloroben-
cilo y o-clorobencilo; alcanóilo de C_1-C_3 , tal como formilo,
acetilo y propionilo; trifenilmetilo (tritilo). Preferible-
10 mente, cuando R_3 y R_4 son grupos de protección, el grupo de
protección de selección en ambos casos es el bencilo.

El grupo R_5 representa ya sea hidrógeno o formilo y
define la porción $>NR_5$ del residuo de triptofano. El formi-
lo sirve como un grupo de protección. El empleo de tal grupo
15 de protección es opcional y, por lo tanto, R_5 aproximadamen-
te puede ser hidrógeno (N-desprotegido) o formilo (N-protegi-
do).

El grupo X se refiere al carboxilo terminal de la ca-
dena del tetradecapéptido; éste puede ser hidroxilo, en cuyo
20 caso se define un grupo carboxilo libre. Además, X represen-
ta el soporte de resina sólida, al cual se enlaza la porción
terminal de carboxilo del péptido durante su síntesis. Esta
resina sólida está representada por la fórmula

25



30

En todo lo anterior, cuando X representa hidroxilo,
cada uno de R , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 , es hidrógeno. Cuando X re-
presenta el soporte de resina sólida, cada uno de R , R_1 , R_2 ,
 R_3 y R_4 es un grupo de protección.

1 Se emplean en la presente las siguientes abreviaturas la mayoría de las cuales son bien conocidas y se utilizan comúnmente en la técnica:

Ala - Alanina

5 Asn - Asparagina

Cys - Cisteína

Gly - Glicina

Lys - Lisina

Phe - Fenilalanina

10 Ser - Serina

Thr - Treonina

Trp - Triptofano

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-bifenilín-isopropiloxicarbonilo)

25 Aunque la selección de los grupos de protección particulares que van a emplearse para preparar los compuestos de fórmula I, permanece como un asunto que cae dentro de la experiencia ordinaria de un químico relacionado con los péptidos sintéticos, se reconoce bien que la secuencia de las reacciones que deben llevarse a cabo da lugar a una selección de un grupo de protección particular. En otras palabras, el grupo de protección de selección puede ser uno que sea estable

30

1 junto a los reactivos como a las condiciones empleadas en
las etapas subsecuentes de la secuencia de reacción. Por ejem
plo, según se discutió ya en cierto grado en la presente con
anterioridad, el grupo de protección particular que se emplea
5 debe ser uno que permanezca intacto bajo las condiciones que
se emplean para disociar el grupo de protección de α -amino
del residuo de aminoácido terminal del fragmento de péptido
en preparación para el acoplamiento del siguiente fragmento
de aminoácido siguiente, a la cadena del péptido. Es también
10 importante seleccionar, como grupo de protección, aquel que
permanezca intacto durante la construcción de la cadena del
péptido y que sea fácilmente separable al término de la sín-
tesis del producto deseado de tetradecapéptido. Todos estos
asuntos están dentro del conocimiento y entendimiento de un
15 químico relacionado con los péptidos de experiencia ordina-
ria en el ramo.

Como es evidente de la discusión anterior, los tetra-
decapéptidos de fórmula I pueden prepararse mediante sínte-
sis en fase sólida. Esta síntesis involucra una construcción
20 en secuencia en la cadena del péptido que empieza en el ex-
tremo C-terminal del péptido. Específicamente, la cisteína
se enlaza primero en su función carboxilo a la resina median-
te reacción de una cisteína S-protegida, amino-protegida con
una resina clorometilada o una resina de hidroximetilo. La
25 preparación de una resina de hidroximetilo se describe por
Bodanszky y otros, Chem. Ind. (Londres), 38 1597-98 (1966).
La resina clorometilada es comercialmente disponible de Lab
Systems, Inc., San Mateo, California.

30 Para lograr el enlace de la cisteína C-terminal con,
la resina, la cisteína protegida primero se convierte en su

1 sal de cesio. Esta sal se hace reaccionar entonces con la re-
sina de acuerdo con el método descrito por B.F. Gisin, Helv.
Chim. Acta, 56, 1476 (1973). Alternativamente, la cisteína
5 puede enlazarse a la resina mediante activación de la fun-
ción carboxilo de la molécula de cisteína mediante la aplica-
ción de técnicas fácilmente conocidas. Por ejemplo, la cis-
teína puede hacerse reaccionar con la resina en presencia de
un compuesto de activación del grupo carboxilo tal como N,N'-
diciclohexilcarbodiimida (DCC).

10 Una vez que se ha entrelazado apropiadamente la cis-
teína libre de carboxilo al soporte de resina, el resto de
la secuencia de construcción del péptido involucra la adi-
ción en etapas de cada aminoácido a la porción N-terminal de
la cadena de péptido. Necesariamente, por lo tanto, la secuen-
15 cia particular que se involucra comprende una disociación
del grupo de protección α -amino del aminoácido, lo cual re-
presenta la porción N-terminal del fragmento de péptido se-
guida por el acoplamiento del siguiente residuo de aminoáci-
do al aminoácido N-terminal ahora libre y reactivo. La diso-
20 ciación del grupo de protección de α -amino puede efectuarse
en presencia de un ácido tal como ácido bromhídrico, ácido
clorhídrico, ácido trifluoroacético, ácido p-toluensulfónico,
ácido bencensulfónico, ácido naftalensulfónico y ácido acéti-
co, con la formación del producto de sal de adición de ácido
25 respectivo. Otro método que es disponible para lograr la di-
sociación del grupo de protección de aminoácido involucra el
empleo de trifluoruro de boro. Por ejemplo, el dietileterato
de trifluoruro de boro en ácido acético glacial convertirá
el fragmento de péptido amino-prottegido a un complejo de BF_3
30 el cual después puede convertirse al fragmento de péptido

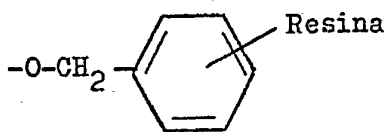
1 desbloqueado mediante tratamiento con una base tal como bi-
carbonato de potasio acuoso. Cualquiera de estos métodos pue
de ser empleado en tanto se reconozca que el método de selec
ción debe ser aquel que logre la disociación del grupo de
5 protección de α -amino N-terminal sin ruptura de ningún otro
grupo de protección presente en la cadena de péptido. A este
respecto, se prefiere que la disociación del grupo de protec
ción N-terminal se logre utilizando ácido trifluoroacético.
En términos generales, la disociación se llevará a cabo a
10 una temperatura de aproximadamente 0°C. a temperatura ambien
te.

Una vez que se ha efectuado la disociación 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 lo
15 lograr la disociación del grupo de protección. El producto pue
de entonces convertirse al compuesto amino terminal libre me
diante tratamiento con una base moderada, típicamente una
amina terciaria tal como piridina o trietilamina.

La cadena del péptido entonces está lista para la reac
20 ción con el siguiente aminoácido. Esto puede lograrse median
te el empleo de cualquiera de varias técnicas reconocidas. A
fín de lograr el acoplamiento del siguiente aminoácido a la
cadena de péptido N-terminal, se emplea un aminoácido que
tiene un carboxilo libre pero que está adecuadamente protegi
do en la función α -amino, así como también en cualquier otra
25 porción activa. El aminoácido entonces se somete a condicio
nes que harán a la función carboxilo, activa con respecto a
la reacción de acoplamiento. Una de tales técnicas de activa
ción que puede emplearse en la síntesis, involucra la conver
30 sión del aminoácido a un anhídrido mixto. Por lo tanto, la

1 función carboxilo libre del aminoácido se activa mediante la
reacción con otro ácido, típicamente un ácido carbónico en
la forma de su cloruro de ácido. Son ejemplos de tales cloru-
5 ros de ácido que pueden utilizarse para formar los anhídri-
dos mixtos apropiados, el cloroformiato de etilo, el cloro-
formiato de fenilo, el cloroformiato de sec-butilo, el cloro-
formiato de isobutilo, y el cloruro de pivaloilo.

Otro método para activar la función carboxilo del ami-
noácido para lograr el acoplamiento es mediante la conver-
10 sión del aminoácido a su derivado de éster activo. Son ejem-
plos de tales ésteres activos, por ejemplo, un éster 2,4,5-
triclorofenílico, un éster pentaclorofenílico, un éster p-ni-
trofenílico, un éster formado de l-hidroxibenzotriazol, y un
éster formado de N-hidroxisuccinimida. Otro método para efec-
15 tuar el acoplamiento del aminoácido C-terminal al fragmento
péptido involucra llevar a cabo la reacción de acoplamiento
en presencia de por lo menos una cantidad equimolar de N,N'-
dodiclohexilcarbodiimida (DCC). Este último método se prefie-
re para preparar el tetradecapéptido de la fórmula II, en
20 donde X es



25 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 resina, protegido, con ácido clorhí-
drico. El tratamiento con ácido clorhídrico disocia el pépti-
30 do de la resina, además, sin embargo, disocia todos los gru-

1 pos de protección restantes presentes en las porciones reac-
tivas colocadas en la cadena del péptido así como también el
grupo de protección de α -amino presente en el aminoácido N-
terminal. Cuando se emplea el ácido fluorhídrico para efec-
5 tuar la disociación del péptido de la resina así como tam-
bién para separar los grupos de protección, se prefiere que
la reacción se lleve a cabo en presencia de anisol. La pre-
sencia de anisol se ha encontrado que inhibe la alquilación
potencial de ciertos residuos de aminoácido presentes en la
10 cadena del péptido. Además, se prefiere que la disociación
se lleve a cabo en presencia de etilmercaptano. El, etilmer-
captano sirve para proteger el anillo de indol del residuo
de triptofano y, además, facilita la conversión de las cis-
teínas bloqueadas a sus formas tiol. También, cuando R₅ es
15 formilo, la presencia del etilmercaptano facilita la disocia-
ción del ácido fluorhídrico del grupo formilo.

Una vez que se ha logrado la reacción de disociación,
el producto que se obtiene es un péptido de cadena recta que
contiene 14 restos de aminoácido. A fin de obtener el produc-
20 to final de fórmula I, es necesario tratar el tetradecapépti-
do de cadena lineal bajo condiciones que efectuarán su oxida-
ción convirtiendo los dos grupos sulfhidrilos en la molécula,
uno en cada porción de cisteínilo a un punto de disulfuro.
Esto puede lograrse tratando una solución diluída del tetra-
25 decapéptido lineal con cualquiera de una variedad de agentes
de oxidación incluyendo, por ejemplo, yodo y ferricianuro de
potasio. Puede emplearse también aire como agente de oxida-
ción, siendo el pH de la mezcla generalmente de aproximada-
mente 2.5 a 9.0, y preferiblemente de aproximadamente 7.0 a
30 7.6. Cuando se utiliza aire como agente de oxidación, la con

1 centración de la solución del péptido generalmente no es ma-
y yor que aproximadamente 0.4 mg. del péptido por ml. de solu-
ción, y usualmente es de aproximadamente 50 µg/ml.

5 Los compuestos de fórmula I, pueden administrarse a
mamíferos de sangre caliente, incluyendo los seres humanos,
mediante cualquiera de varios métodos, incluyendo la forma
oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa y
otras rutas de administración adecuadas. Cada uno de estos
10 compuestos es activo, aunque no necesariamente en un grado
equivalente, para inhibir la liberación de la hormona de de-
sarrollo. Este efecto inhibitorio es benéfico en aquellos ca-
sos en los cuales el huésped que se está tratando requiere
de un tratamiento terapéutico para una secreción en exceso
de somatotropina, tal secreción está asociada con condicio-
15 nes adversas tales como la acromegalia y la diabetes juvenil.
Estos compuestos también inhiben otros efectos fisiológicos
incluyendo la inhibición de la secreción de ácido gástrico,
son útiles en el tratamiento de estados ulcerosos; la inhibi-
ción de la secreción exocrina del páncreas es potencialmen-
20 te útil en el tratamiento de la pancreatitis; la inhibición
de la secreción de insulina y glucagon, y la reducción de
los nervios útil en la radiología gastrointestinal. Preferi-
blemente, la escala de dosis para administración sublingual
u oral es de aproximadamente 1 mg. a 100 mg./kg. de peso del
25 cuerpo por día. Generalmente, una escala de dosis para admi-
nistración intravenosa; subcutánea o intramuscular es de
aproximadamente 10 µg, a 1 mg/kg. de peso del cuerpo por día
y, preferiblemente es de aproximadamente 50 µg. a 100 µg/kg.
de peso del cuerpo por día. Es evidente que la escala de do-
30 sis variará ampliamente dependiendo del estado particular .

1 que se está tratando así como también de la gravedad del estado.

5 Es también posible administrar los compuestos de fórmula I en asociación con un portador farmacéutico, por ejemplo, en forma de tabletas o cápsulas. Pueden utilizarse portadores o diluyentes inertes, por ejemplo, carbonato de magnesio o lactosa, junto con agentes de desintegración convencionales tales como almidón de maíz y ácido algínico, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio. Típicamente, la cantidad de portador o diluyente variará de aproximadamente 5 a 95 por ciento de la composición final, y preferiblemente de aproximadamente 50 a 85% de la composición final. Pueden emplearse también agentes saborizantes adecuados en la preparación final que hacen a la composición de gusto más agradable en la administración.

15 Cuando los compuestos de fórmula I, se van a administrar intravenosamente, pueden emplearse portadores adecuados tales como, por ejemplo, solución salina isotónica y solución de tampón de fosfato.

20 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la preparación de los compuestos de fórmula I, y sus intermediarios.

Ejemplo 1

RESINA DE POLIESTIRENO METILADO DE N-t-BUTILOXICARBONIL-L-CISTEINIL(S-p-METOXIBENCIL)

25 A 500 ml. de N,N-dimetilformamida (DMF) que contiene la sal de cesio de N-t-butiloxicarbonil(S-p-metoxibencil)cisteína [preparada a partir de 9.06 g. (26.5 mmoles) del ácido libre], se agregaron 51.0 g. de resina de poliestireno clorometilado (Lab Systems, Inc., 0.75 mmoles/gramo). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante seis días. La re

30

1 sina se filtró entonces y se lavó sucesivamente tres veces
con una mezcla de 90 por ciento de dimetilformamida y 10 por
ciento de agua, tres veces con 95 por ciento de etanol, y
tres veces con dimetilformamida. A la resina suspendida en
5 500 ml. de dimetilformamida, se agregó una solución de 10.5
gramos de acetato de cesio. La mezcla se agitó durante seis
días a temperatura ambiente. La resina se agitó entonces y
se lavó sucesivamente, una vez con dimetilformamida acuosa,
tres veces con una mezcla de 90 por ciento de dimetilformami
10 da y 10 por ciento de agua, tres veces con 95 por ciento de
etanol, tres veces con cloruro de metileno, tres veces con
95 por ciento de etanol y tres veces con cloroformo. Se sepa
raron los trozos mediante la suspensión de la resina en cloro
formo cuatro veces y cada vez extrayendo líquido. La resina
15 se secó entonces a vacío a 40°C. toda la noche para obtener
44.8 g. del producto del título. Un análisis de aminoácido
mostró 0.25 mmoles de Cys por gramo de resina. Se determinó
la cisteína como ácido cistéico a partir de una hidrólisis
ácida llevada a cabo utilizando una mezcla 1:1 de dioxano y
20 ácido clorhídrico concentrado, al cual se agregó una pequeña
cantidad de sulfóxido de dimetilo.

Ejemplo 2

RESINA DE POLIESTIRENO METILADO DE N-t-BUTILOXICARBONIL-D-
VALIL-GLICIL-L-(S-p-METOXIBENCIL)CISTEINIL-L-(N-ε-o-CLOROBEN
25 CILOXICARBONIL)-LISIL-L-ASPARAGINIL-L-FENILALANIL-L-FENILALA
NIL-L-(FORMIL)TRITOFIL-L-(N-ε-o-CLOROBENCILOXICARBONIL)-LISIL-
L-(O-BENCIL)TREONIL-L-FENILALANIL-L-(O-BENCIL)TREONIL-L-(O-
BENCIL)SERIL-L(S-p-METOXIBENCIL)CISTEINILO.

30 El producto del ejemplo 1 (7.0 gramos) se colocó en
el recipiente de reacción de un sintetizador de péptido auto

1 mático Beckman 990 y se agregaron doce de los trece aminoácidos
restantes, empleando el sinterizador automático. La resina de
tridecapéptido protegida resultante, se dividió en dos porciones
iguales y el resto final se introdujo a una de las porciones. Los
5 aminoácidos que se emplearon, así como también la secuencia de su
empleo, es la siguiente: (1) N-t-butiloxicarbonil-(O-bencil)-
L-serina; (2) N-t-butiloxicarbonil-(O-bencil)-L-treonina; (3)
N-t-butiloxicarbonil-L-fenilalanina; (4) N-t-butiloxicarbonil-
(O-bencil)-L-treonina; (5) N-t-butiloxicarbonil-N-o-clorobencilo-
10 xicarbonil-L-lisina; (6) N-t-butiloxicarbonil-(N-formil)-L-triptofano;
(7) N-t-butiloxicarbonil-L-fenilalanina;
(8) N-t-butiloxicarbonil-L-fenilalanina; (9) N-t-butiloxi-carbo-
nil-L-asparagina, éster p-nitrofenílico; (10) N-t-butiloxi-car-
bonil-N-o-clorobenciloxicarbonil-L-lisina; (11) N-t-butilo-
15 xicarbonil-(S-p-metoxibencil)-L-cisteína; (12) N-t-butiloxi-
carbonilglicina; y (13) N-t-butiloxicarbonil-D-valina. La se-
cuencia de desprotección, neutralización, acoplamiento y rea-
coplamiento para la introducción de cada aminoácido en el
péptido es la siguiente: (1) tres lavados (10 ml./gramo de
20 resina) de tres minutos cada uno, con cloroformo; (2) sepa-
ración 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 por
ciento de cloroformo, 6 por ciento de trietilsilano, y 17
25 por ciento de cloruro de metileno; (3) dos lavados (10 ml./
gramo de resina) de tres minutos cada vez, 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-
na) de tres minutos cada vez, con una mezcla de 90 por cien-
30 to de alcohol t-butílico y 10 por ciento de alcohol t-amili-

1 co; (6) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada vez, con cloruro de metileno; (7) neutralización mediante tres tratamientos de tres minutos cada vez con 10 ml./gramo de resina de 3 por ciento de trietilamina en cloruro de metileno; (8) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada vez con cloruro de metileno; (9) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada vez con una mezcla de 90 por ciento de alcohol t-butílico y 10 por ciento de alcohol t-amílico; (10) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada vez con cloruro de metileno; (11) la adición de 1.0 mmoles/gramo de resina del aminoácido protegido y 1.0 mmoles/gramo de resina de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en 10 ml./gramo de resina de cloruro de metileno, mezclando después durante 120 minutos; (12) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada vez con cloruro de metileno; (13) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada vez, 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 vez con cloruro de metileno; (15) neutralización mediante tres tratamientos de tres minutos cada vez con 10 ml./gramo de resina de 3 por ciento de trietilamina en cloruro de metileno; (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-butilo y 10 por ciento de alcohol t-amilo; (18) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con cloruro de metileno; (19) tres lavados (10 ml./gramos de resina) de tres minutos cada uno con dimetilformamida; (20) Adición de 1.0 mmoles/

1 gramo de resina del ácido amino protegido y 1.0 mmoles/gramo
de resina del N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) in 10 ml/
gramo de resina de una mezcla de DMF en relación 1:1 y cloru
ro de metileno seguido de mezcla durante 120 minutos; (21)
5 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 la-
vados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con
una mezcla de 90 por ciento de alcohol t-butilo y 10 por
10 ciento de alcohol t-amilo; (24) tres lavados (10 ml./gramo
de resina) de tres minutos cada uno con cloruro de metileno;
(25) neutralización mediante tres tratamientos de tres minu-
tos cada uno con 10 ml/gramo de resina de tres por ciento
de trietilamina en cloruro de metileno; (26) tres lavados
15 (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada uno con cloru-
ro de metileno; (27) tres lavados (10 ml/gramo de resina) de
tres minutos cada uno con una mezcla de 90 por ciento de al-
cohol t-butilo y 10 por ciento de alcohol t-amilo; y (28)
tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos cada
20 uno con cloruro de metileno.

El tratamiento antes mencionado se emplea por adición
de cada uno de los ácidos amino con la excepción de los res-
tos de asparagina y glicina. La adición del resto de glicina
emplea únicamente las etapas 1-18. El resto de asparagina se
25 incorporó a través de su éster activo p-nitrofenílico. Al
hacerlo así, la etapa (11) anterior se modificó a la siguien-
te secuencia de tres etapas: (a) tres lavados (10 ml./gramo
de resina) de tres minutos cada vez con dimetilformamida;
(b) adición de 1.0 mmoles/gramo de resina del éster p-nitrò-
30 fenílico de N-t-butiloxicarbonil-L-asparagina en 10 ml./gra-

1 mo de resina de una mezcla de 1:3 de dimetilformamida y clo-
ruro de metileno, mezclando después durante 720 minutos; y
(c) tres lavados (10 ml./gramo de resina) de tres minutos ca-
da vez con dimetilformamida. También, la etapa (2) anterior
5 se modificó al empleo del éster p-nitrofenílico de N-t-buti-
loxicarbonil-L-asparagina en una mezcla de 3:1 de dimetilfor-
mamida y cloruro de metileno, mezclando después durante 720
minutos.

10 La resina de péptido terminado se secó al vacío. Se
hidrolizó una porción del producto, poniendo a reflujo duran-
te 72 horas en una mezcla de ácido clorhídrico y dioxano. El
análisis de aminoácido del producto resultante, dió los si-
guientes resultados, empleándose la lisina como referencia:
Asn, 1.04; 2Thr, 2.68; Ser, 1.08; Val, 1.12; Gly, 1.04; 3Phe
15 3.87; 2Lys, 2.00, Trp, 0.75.

Se determinó triptofano mediante una hidrólisis de 21
horas de una muestra del producto en presencia de sulfóxido
de dimetilo y ácido tioglicólico. La cisteína no se determi-
nó ya que ésta se destruye por el método de análisis.

20 Ejemplo 3

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

25 A una mezcla de 5 ml. de anisol y 5 ml. de etilmercap-
tano, se agregaron 2.828 gramos (a un nivel de sustitución
de 0.150 mmoles/gramo) de la resina de tetradecapéptido pro-
tegida del ejemplo 2. La mezcla se enfrió en nitrógeno líqui-
do, y se agregaron mediante destilación 56 ml. de ácido
fluorhídrico líquido. La mezcla resultante se dejó calentar
30 a 0°C., y se agitó durante 2 horas. Se separó entonces el

1 ácido fluorhídrico mediante destilación, y se agregó éter a
la mezcla restante. La mezcla se enfrió a 0°C., y el sólido
resultante se recogió mediante filtración y se lavó con éter.
El producto se secó, y el tetradecapéptido desprotegido se
5 extrajo de la mezcla de resina utilizando ácido acético 1 mo-
lar, y una pequeña cantidad de ácido acético glacial. La so-
lución de ácido acético se liofilizó inmediatamente a seque-
dad en la oscuridad. El sólido blanco resultante se suspen-
dió en una mezcla de 10 ml. de ácido acético 0.2 molar desga-
10 sificado y 4 ml. de ácido acético glacial. La suspensión re-
sultante se calentó; sin embargo, el sólido no se disolvió
completamente. La porción insoluble se filtró y el filtrado
incolore, opaco, se aplicó a una columna Sephadex G-25 F.
Las condiciones cromatográficas fueron: disolvente, ácido
15 acético desgasificado 0.2 molar; tamaño de la columna 7.5 x
150 cm. temperatura, 26°C., régimen de flujo 629 ml./hora;
volúmen de la fracción, 22.0 ml.

El gráfico de la absorbancia a 280 mμ de cada frac-
ción frente al número de fracción, indicó un gran máximo se-
20 guido de un hombro. La espectroscopía ultravioleta reveló
que el máximo principal fué el producto. Las fracciones que
se combinaron y sus volúmenes de elución, fueron los siguien-
tes:

Fracciones 224-240 (4906-5280 ml., máximo = 5054 ml).

25 Esta colección de fracciones no incluye el hombro si-
guiente. La espectroscopía ultravioleta indicó que estuvie-
ron presentes 175 mg. del producto (rendimiento = 24.8%).
Una titulación de Ellman de una alícuota indicó un contenido
libre de sulfhidrilo de 93.6% del teórico.

30

Ejemplo 4

1

OXIDACION DE D-VAL¹-SOMATOSTATINA

5

La solución de la D-Val¹-somatostatina reducida (374 ml., teóricamente 175 mg.) del ejemplo 3, se diluyó con 147 ml. de ácido acético 0.2 molar y 2967 ml. de agua destilada para lograr una concentración de 50 µg/ml. Se agregó hidróxido de amonio concentrado para ajustar el pH de la mezcla a 6.7. La solución se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 64 horas, después de lo cual una titulación de Ellman indicó que la oxidación fué completa.

10

La mezcla se concentró a vacío a un volumen de aproximadamente 10 ml. El concentrado se diluyó con 10 ml. de ácido acético glacial, y después se desalificó en una columna Sephadex G-25 F. Las condiciones cromatográficas fueron como sigue: disolvente, ácido acético desgasificado 50%; tamaño de columna 5.0 x 90 cm.; temperatura, 26°C., régimen de flujo, 246 ml./hora; volumen de la fracción, 16.4 ml.

15

20

La gráfica de la absorbancia a 280 mµ para cada fracción frente al número de fracción, indicó dos grandes máximos. El primer máximo representó las formas agregadas del producto, y el segundo máximo representó un producto monomérico. El material representado por el segundo máximo [fracciones 49-64 (787-1050 ml.)] se recogió y se liofilizó a sequedad en la oscuridad. El sólido resultante se disolvió en 15 ml. de ácido acético 0.2 molar desgasificado y se aplicó a una columna de Sephadex G-25 G. Las condiciones cromatográficas fueron: disolvente, ácido acético desgasificado 0.2 molar; tamaño de la columna, 5.0 x 150 cm; temperatura, 25°C.; régimen de flujo, 475 ml./hora; volumen de la fracción, 16.6 ml.

25

30

La gráfica de la absorbancia a 280 mµ, para cada frac

1 ción frente al número de fracción mostró un gran máximo. La
espectroscopía ultravioleta indicó que la parte principal
del máximo fue el producto. Las fracciones 157-172 (volúme-
5 nes de elución de 2590-2855 ml., máximo = 2667 ml.), se combi-
naron y se liofilizaron a sequedad en la oscuridad. La espec-
troscopía ultravioleta indicó 95 mg. del producto deseado
(rendimiento de la forma reducida = 54.3%).

Se disolvió una porción del sólido resultante en 5 ml
de 50% de ácido acético y se recromatografió en una columna
10 de Sephadex G-25 F. Las condiciones cromatográficas fueron:
disolvente, ácido acético al 50% desgasificado; tamaño de co-
lumna, 2.5 x 180 cm.; temperatura, 26°C.; régimen de flujo,
53.2 ml./hora; volúmen de la fracción 8.87 ml.

La gráfica de la absorbancia a 280 mμ de cada frac-
15 ción frente al número de fracción, indicó un gran máximo. La
espectroscopía ultravioleta indicó la porción mayor del máxi-
mo del producto. Las fracciones 56-69 (488-532 ml., máximo =
= 505 ml.) se combinaron y se liofilizaron a sequedad en la
oscuridad.

20 Rotación óptica $[\alpha]_D^{26} = -42.1$ (1 por ciento de áci-
do acético).

Análisis de aminoácido: Val, 0.98; Gly, 1.01; 2Cys,
1.81; 2Lys, 1.99; Asn, 0.95; 3Phe, 2.94; Trp, 0.80; 2Thr,
1.91; Ser, 0.85.

25 Los resultados anteriores se expresan como relaciones
a (Gly + Lys)/3 = 1.0. Se llevaron a cabo las tres siguien-
tes hidrólisis de 21 horas:

(1) En presencia de sulfóxido de dimetilo para oxidar
la cisteína a ácido cisteico.

30 (2) Acido tioglicólico eliminado.

1 (3) Sin eliminador u oxidante.

Todos los valores anteriores son promedio de las tres hidrólisis, excepto los siguientes:

5 Cys y Ser; únicamente (1) y (3);

Trp; únicamente (2);

Phe; únicamente (2) y (3).

10 Se probó la D-Val¹-somatostatina en perros para su inhibición in vivo de la secreción del ácido gástrico. En seis perros con fístula crónica y bolsa de Heidenhain, se indujo la secreción gástrica de HCl mediante infusión del tetrapéptido C terminal de gastrina a 0.5 µg/kg-hr. Cada perro sirvió como su propio control, recibiendo en un día separado únicamente tetrapéptido. Al otro día, los seis perros recibieron el tetrapéptido y después de una hora de secreción de estado estable de HCl, se infundió la D-Val¹-somatostatina a 15 0.75 µg/kg-hr. durante una hora. La recolección de las muestras de ácido gástrico se continuó durante 1.5 horas adicionales a intervalos de 15 minutos. Las muestras se titularon a un pH de 7 con un titulador automático. El efecto inhibitorio máximo de la D-Val¹-somatostatina se extrapoló contra la 20 curva de dosis-respuesta de somatostatina, y la potencia relativa del análogo, con respecto a aquella de la somatostatina se expresa como porcentaje de actividad. La D-Val¹-somatostatina inhibió la secreción de ácido de estado estable inducida por el tetrapéptido C-terminal de gastrina en 25 85.1± 6.0% de error promedio de interpretación. Este efecto es equivalente a aquel de 0.935 µg/kg-hr. de somatostatina. Su actividad relativa con respecto a aquella de la somatostatina de esta manera es de 125%.

30 Se probó también la D-Val¹-somatostatina en cuanto a

1 su acción en la motilidad de los intestinos en perros cons-
cientes. Se utilizaron tres perros que tienen cateteres den-
tro de conductos de órganos tubulares colocados en el antro,
duodeno y píloro. Se registraron los cambios de presión en
5 el conducto intestinal en un Visicorder utilizando galvanóme-
tros de haz de luz en miniatura y calibradores de esfuerzo.
Después de que se estableció un control de estado estable,
se infundió intravenosamente la D-Val¹-somatostatina durante
un período de diez minutos. El compuesto inicialmente incre-
10 mentó la presión dentro del conducto en el píloro y después
disminuyó mientras que la presión en el duodeno y en el an-
tro permanecieron deprimidas a través de la prueba. En la do-
sis efectiva mínima requerida para incrementar la presión pi-
lórica y para disminuir las presiones del antro y del duode-
15 no fue de menos que 0.125 µg/kg-10 minutos. Esto se compara
con una actividad para la somatostatina misma de 0.125 a 0.25
µg/kg-10 minutos.

La D-Val¹-somatostatina mostró también inhibir la se-
creción pancreática. En tres perros que tienen fístula tanto
20 pancreática como gástrica total, se indujo la secreción del
pancreas mediante la infusión de secretina en 2 unidades/kg-
hr. y colecistokinina a 0.45 unidades/kg-hr., y la secreción
del HCl gástrico mediante infusión de tetragastrina a 0.5
µg/kg-hr. Después de que se estableció una respuesta estable,
25 cada perro recibió D-Val¹-somatostatina durante una hora a
0.75 µg/kg-hr. El efecto inhibitorio máximo expresado como
porcentaje de cambio sobre el control para la proteína total
fue de -51%.

30 Se probó también la D-Val¹-somatostatina en cuanto a
su actividad con respecto a la liberación de la hormona del

1 desarrollo. El procedimiento que se empleó se llevó a cabo
utilizando ratas Sprague-Dawley machos, normales, que pesan
100-120 gramos (Laboratorio Supply Company, Indianapolis, In-
diana). La prueba es una modificación del método de P. Bra-
5 zeau, W. Vale, y R. Guilleman, *Endocrinology*, 94 184 (1974).
En este análisis, se emplearon cinco grupos de ocho ratas ca-
da uno. Se administró intraperitonealmente pentobarbital só-
dico a todas las ratas para estimular el desarrollo de la se-
creción hormonal. Un grupo sirvió como el control y recibió
10 únicamente solución salina. Dos de los grupos recibieron so-
matostatina, 1 a 2 $\mu\text{g}/\text{rata}$, subcutáneamente, y el otro a 50
 $\mu\text{g}/\text{rata}$, subcutáneamente. Los otros dos grupos recibieron D-
Val¹-somatostatina, uno a 2 $\mu\text{g}/\text{rata}$, subcutáneamente, y el
otro a 50 $\mu\text{g}/\text{rata}$, subcutáneamente. La concentración del sue-
15 ro de la hormona del desarrollo se midió 20 minutos después
de la administración simultánea del pentobarbital sódico y
el compuesto de prueba. El grado de inhibición de la concen-
tración de la hormona en el suero, fue determinada entonces
con respecto al grupo de control, y se compararon las activi-
20 dades relativas de la D-Val¹-somatostatina y la somatostati-
na misma.

A un nivel de dosis de 2 $\mu\text{g}/\text{rata}$, la D-Val¹-somatosta-
tina inhibió el incremento en la secreción de la hormona del
desarrollo en 2% sobre el control, mientras que la somatosta-
25 tina produjo una inhibición de 44%. A un nivel de dosis de
40 $\mu\text{g}/\text{rata}$, la D-Val¹-somatostatina inhibió el incremento en
la secreción de la hormona del desarrollo en 73% sobre el
control, mientras que la somatostatina misma produjo una in-
hibición de 79%.

30 La D-Val¹-somatostatina se probó en cuanto a su acti-

1 vidad in vivo en la inhibición de la secreción de insulina y
glucagon mediante la estimulación con L-alanina. Se dejaron
en ayunas toda la noche, perros de raza indefinida, de cual-
quier sexo. Se obtuvieron muestras de sangre de control y
5 después se inició una infusión intravenosa de solución salina,
somatostatina o D-Val¹-somatostatina. Después de 30 minu-
tos, se administró adicionalmente L-alanina en forma intrave-
nosa, durante un período de 15 minutos. La infusión de solu-
ción salina, de somatostatina o de D-Val¹-somatostatina se
10 continuó durante 15 minutos después del término de la infu-
sión de L-alanina. La infusión de L-alanina provocó un incre-
mento brusco en la concentración en el suero de glucagon e
insulina, que regresó a la concentración de control al térmi-
no de la infusión de L-alanina. De los anteriores se determinó
15 que la dosis mínima de D-Val¹-somatostatina para la inhibi-
ción de glucagon es de 0.06 a 0.11 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$ y para la inhi-
bición de insulina es de 0.006 a 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$, mientras
que la dosis mínima de somatostatina para la inhibición de
glucagon es de 0.10 a 0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$, y para la inhibición
20 de insulina es de 0.3 a 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$

En resumen, la presente Patente de Invención
que se solicita deberá recaer en las siguientes:

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de
25 nuevos derivados de somatostatina de fórmula I, H-D-Val-
Gly-L-Cys-L-Lys-Asn¹-l'phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-Phe-L-Thr-L-
Ser-L-Cys-Om, y las sales de adición de ácido, no tóxicas,
farmaceuticamente aceptables del mismo, que se caracteriza
por hacer reaccionar el tetradecapéptico de cadena lineal,
30 correspondiente, de fórmula III, H-D-Val-Gly-L-Cys-L-Lys-

1 L-Asn-L-Phe-L-Phe-L-Trp-L-Lys-L-Thr-L-Phe-L-Thr-L-Ser-L-
Cys-OH, con un agente de oxidación.

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

5 3. Se reivindica por último como objeto so-
bre el que ha de recaer la patente de invención que se
solicita: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE NUEVOS
DERIVADOS DE SOMATOSTATINA".

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

Madrid, 20 de Abril de 1978

BERNARDO UNGRIA
P.P.



15

20

25

30