



(19) ES (11) (21)

NUMERO
471.243
FECHA DE PRESENTACION
28-6-78

(12) A. I.

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

(30) PRIORIDADES:		
(31) NUMERO	(32) FECHA	(33) PAIS
27140/77	29-6-77	Gran Bretaña...
(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C/A 61K	
(64) TITULO DE LA INVENCION		
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN PEPTIDO.-		
(71) SOLICITANTE (S)		
BEECHAM GROUP LIMITED.-		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE		
Beecham House, Great West Road, Brentford, Middlesex-GRAN BRETAÑA		
(72) INVENTOR (ES)		
Peter Roy; Brian George Overell y Denis Raymond Stanworth, todos ellos de nacionalidad británica.		
(73) TITULAR (ES)		
(74) REPRESENTANTE		
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU.-		

1

Esta invención se refiere a ciertos péptidos útiles para la terapia de desensibilización y a composiciones desensibilizantes que los contienen.

5

Es sabido que muchas sustancias son capaces de liberar histamina de las células mastoideas. Esta liberación es frecuentemente debida a la rotura de la membrana celular y los reactivos que se comportan de esta manera se dice que son no selectivos. Uno de los sistemas fisiológicos que produce la liberación de histamina implica la unión de un anticuerpo a la superficie de la célula. Cuando el anticuerpo reacciona con su antígeno apropiado, se inicia un proceso que conduce a la liberación de histamina. Se ha postulado que esta reacción antígeno-anticuerpo produce deformación de la molécula de anticuerpo de manera que una parte de la misma se pone en contacto con la superficie de la célula, iniciando con ello la respuesta. La liberación de histamina desencadenada de esta manera no implica la ruptura de la membrana celular y se dice que es selectiva (véase D.R. Stanworth, "Immediate Hypersensitivity", capítulo 8, North Holland Publishing Company, London, 1973).

10

15

20

Experimentalmente, las liberaciones no selectiva y selectiva de la histamina pueden distinguirse respectivamente por la presencia o ausencia de enzimas intracelulares liberadas simultáneamente o de cromo radiactivo previamente absorbido por la célula.

25

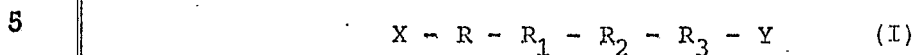
Ahora creemos que pueden utilizarse sustancias capaces de producir la liberación selectiva de histamina en la terapia de desensibilización de pacientes humanos alérgicos.

30

Un objeto de esta invención es proporcionar una nueva clase de péptidos que poseen esta propiedad y composiciones

1 desensibilizantes, especialmente vacunas que contienen estos péptidos.

Por consiguiente, esta invención proporciona un péptido de fórmula (I):



y sales del mismo, constituido por 6 a 12 restos de aminoácidos naturales, donde R es un grupo opcionalmente presente, capaz de comunicar a un péptido resistencia a la descomposición por enzimas; R₁ representa un resto de un aminoácido básico, opcionalmente ligado a uno o más restos de aminoácidos neutros o hidrófobos y/o aminoácidos básicos; R₂ representa un resto de un aminoácido neutro no hidrófobo, opcionalmente ligado a uno o más restos de aminoácidos neutros no hidrófobos; R₃ representa un resto de un aminoácido hidrófobo, opcionalmente ligado a uno o más restos de aminoácidos neutros no hidrófobos y/o aminoácidos hidrófobos; X es hidrógeno o un grupo protector del N e Y es hidroxilo o un grupo protector del C terminal.

20 Salvo indicación en contrario, los aminoácidos a los que nos referiremos más adelante se encuentran en la configuración L.

25 Cuando está presente el grupo R, es un grupo capaz de comunicar a un péptido resistencia a la descomposición por enzimas. Son ejemplos de grupos R adecuados los incluidos en la obra de J. Rudinger, "The Design of Peptide Hormone Analogues"; capítulo 9, in Drug Design, volumen II, editado bajo la dirección de E.J. Ariens, Academic Press, New York y Londres, 1971.

30 Así, entre los ejemplos adecuados del grupo R, cuando está presente, se encuentran prolilo, hidroxiprolilo, la for

1 ma D de un resto de un aminoácido común o un resto de un aminoácido con omisión del grupo amino terminal.

5 Son ejemplos adecuados de R_1 los siguientes: arginilo, lisilo y ornitilo y combinaciones de estos restos, opcionalmente con uno o varios restos de aminoácidos neutros no hidrófobos tales como treonilo y serilo. Son ejemplos especialmente adecuados de R_1 Lis—Tre—Lis, Arg—Lis—Tre—Lis y similares. Normalmente R_1 está constituido por 1 a 5 restos de aminoácidos, adecuadamente 3 a 5 restos. Frecuentemente R_1 contiene por lo menos dos restos de aminoácidos básicos y por lo menos un resto de un aminoácido neutro no hidrófobo.

10 Son ejemplos adecuados de aminoácidos neutros no hidrófobos R_2 los siguientes: glicilo, alanilo, serilo y treonilo y combinaciones de estos restos. Un ejemplo especialmente adecuado de R_2 es Gli—Ser—Gli. Preferiblemente R_2 está constituido por 1 a 5 restos de aminoácidos, por ejemplo 3 restos de aminoácidos.

15 Son ejemplos adecuados de los aminoácidos hidrófobos R_3 los restos de aminoácidos nocionalmente derivados de alanina β -sustituída con un grupo hidrófobo aromático o alifático, tales como fenilalanilo, valilo y leucilo y combinaciones de estos restos. Son ejemplos especialmente adecuados de R_3 Phe—Phe y Phe—Phe—Val—Phe. Preferiblemente R_3 está constituido por 1 a 4 restos de aminoácidos, por ejemplo 2 o 4 restos.

20 X es hidrógeno o un grupo N-protector. Son ejemplos adecuados de los grupos X N-protectores los conocidos convencionalmente para esta aplicación en la química de los péptidos. Son ejemplos de estos grupos los grupos ácido carboxílico como acetilo, cloroacetilo, trifluoracetilo, butirilo, ben-

25

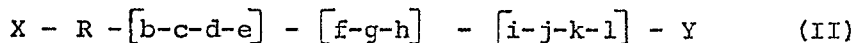
30

1 zoflo, fenilacetilo, piridincarbonilo; o un grupo ácido deri-
vado del ácido carbónico tal como etoxicarbonilo, benciloxi-
carbonilo, ter-butiloxicarbonilo, bifenilisopropoxicarbonilo,
5 p-metoxi-benciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bro-
mobenciloxicarbonilo, p-fenilazobenciloxicarbonilo, p-(p'-me-
toxifenilazo)benciloxicarbonilo, ter-amiloxicarbonilo; o un
grupo ácido derivado de un ácido sulfónico o p-toluensulfó-
nico; u otros grupos como bencilo, tritilo, formilo, ftaloílo,
10 o-nitrofenilsulfénilo, bencilideno o nitro. Los grupos X N-
protectores preferidos son ter-butiloxicarbonilo o benciloxi-
carbonilo.

Los grupos Y protectores del C terminal adecuados son
los restos éster, por ejemplo restos de ésteres alquílicos
15 C₁₋₆ como metoxi, etoxi y ter-butoxi; benciloxi, p-nitrobencil-
oxi, p-metoxibenciloxi; restos de ésteres trimetilsilílicos
y restos de amidas, amidas sustituidas (v.g. amidas sustitui-
das con uno o dos grupos alquilo C₁₋₆ o con un grupo acilo
C₁₋₆) y restos hidrazino. Los grupos Y preferidos son hidro-
xilo y metoxi.

20 Los péptidos de la invención contienen 6 a 12 restos
de aminoácidos. Preferiblemente contienen 8 a 10 restos de
aminoácidos.

Un grupo especialmente adecuado de péptidos es el de
fórmula (II):



30 donde X, Y y R son los definidos anteriormente; c y e son
lisilo, arginilo u ornitilo; d es treonilo o serilo; b es
un grupo arginilo, lisilo u ornitilo opcionalmente presente;
f y h son glicilo o alanilo; g es serilo o treonilo; y y j
son fenilalanilo, valilo o leucilo y k y l son fenilalanilo,

1 valilo o leucilo opcionalmente presentes; y sales de los
mismos.

Preferiblemente en la fórmula (II), X es hidrógeno e
Y es hidroxilo, $-NH_2$ o alcoxi C_{1-4} tal como metoxi y, cuan-
5 do R está presente, es prolilo o hidroxipropilo.

Son ejemplos de péptidos dentro de esta invención los
siguientes:

Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe - Y^1
Arg Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe - Y^1
10 Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe Val Phe - Y^1
Arg Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe Val Phe - Y^1
Pro Arg Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe - Y^1
Pro Arg Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe Val Phe - Y^1
donde Y^1 es hidroxilo, $-NH_2$ o metoxi.

15 Los péptidos de esta invención pueden prepararse por
métodos conocidos en el campo de la síntesis de los péptidos
que consisten en copular los aminoácidos de los que deriva el
péptido secuencialmente para construir el péptido deseado.

20 Los métodos de copulación secuencial de aminoácidos pa-
ra formar péptidos por formación de uniones amida son muy
conocidos. En general, los aminoácidos, provistos de grupos
protectores cuando sea necesario, se copulan en el orden
correcto o se combinan péptidos más pequeños en unidades ma-
yores. La unión amida se prepara habitualmente condensando
25 un aminoácido, o péptido, con un grupo α -amino protegido y
un grupo carboxilo terminal libre o activado, con un amino-
ácido o péptido con un grupo carboxilo protegido y un grupo
 α -amino libre.

30 La activación del grupo carboxilo puede efectuarse, por
ejemplo, convirtiendo el grupo carboxilo en un haluro de áci

1 do, una azida, anhídrido o imidazolida o en un éster activo
tal como el éster cianometílico, éster p-nitrofenílico, éster
2,4,5-triclorofenílico, éster de N-hidroxisuccinimida y
éster de benzotriazol.

5 Los métodos más ampliamente utilizados de condensación
de aminoácidos o péptidos son el método de la carbodiimida,
el método de la azida, el método del anhídrido y el método
de los ésteres activados, como describen, por ejemplo,
Schroder y Lubke en "The Peptides", volumen 1 (1969), (Aca-
10 demic Press). Otro método posible es el método en fase sólida
de Merrifield (J.Am.Chem.Soc., 85, 2149 (1963)).

15 Cualquier grupo reactivo en el aminoácido o péptido que
no tome parte en la reacción de condensación debe ser prote-
gido mediante cualquiera de los grupos N-protectores o gru-
pos protectores del carboxilo antes descritos, que pueden
ser fácilmente separados después de la condensación.

20 La separación del grupo o grupos protectores presentes
en el péptido resultante puede efectuarse mediante un pro-
cedimiento apropiado que depende del tipo o tipos de grupos
protectores. Algunos procedimientos típicos son los si-
guientes: hidrogenación en presencia de catalizador de pala-
dio (v.g. paladio en carbón, negro de paladio) para los gru-
pos benciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromo-
25 benciloxicarbonilo, p-fenilazobenciloxicarbonilo, p-(p'-meto-
xifenilazo)benciloxicarbonilo y tritilo que protegen el ex-
tremo amino; tratamiento con bromuro de hidrógeno en ácido
acético glacial para los grupos benciloxicarbonilo, p-bro-
mobenciloxicarbonilo, p-fenilazobenciloxicarbonilo y t-butil-
30 oxicarbonilo que protegen el extremo amino; tratamiento con
sodio metálico en amoniaco líquido para los grupos bencil-

1 oxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo y tosílo que prote-
gen el extremo amino; tratamiento con ácido clorhídrico y/o
ácido acético para los grupos tritilo, t-butiloxicarbonilo,
formilo y bencilideno que protegen el extremo amino; trata-
5 miento con un álcali para los ésteres metílico, etílico y
bencílico que protegen el extremo carboxilo; tratamiento
con un ácido para los ésteres metílico, etílico, bencílico,
p-metoxibencílico y t-butílico que protegen el extremo car-
boxilo; e hidrogenación en presencia de catalizador de pala-
10 dio para los ésteres bencílico y p-nitrobencílico que prote-
gen el extremo carboxilo.

Están incluídas dentro de esta invención las sales de
adición de ácidos de los compuestos de fórmula (I), por ejem-
plo las sales de ácidos farmacéuticamente aceptables como
15 los hidrohaluros, especialmente el hidrocioruro o hidrobromuro
o los fosfatos, acetatos, fenilpropionatos, maleatos,
tartratos y citratos.

Los péptidos y sales de esta invención pueden emplearse
como agentes activos en vacunas de desensibilización. Estas
20 vacunas son muy conocidas por los expertos en este campo y
comprenden un vehículo líquido estéril en el que el agente
activo está disuelto o suspendido. Si está suspendido, las
partículas de agente activo deben ser suficientemente peque-
ñas para no bloquear el orificio de una aguja de inyección.
25 Frecuentemente se incluyen en estas composiciones de vacuna
algunos coadyuvantes como tirosina y se cree que proporcionan
un soporte y una liberación lenta prolongada del material
activo in vivo. Habitualmente se administran al paciente que
está recibiendo el tratamiento con estas vacunas desensibi-
lizantes varias inyecciones, extendidas sobre un periodo de
30

1 semanas o días, conteniendo cada inyección una concentra-
ción de agente activo mayor que la precedente. De esta forma,
el paciente es desensibilizado de manera que su reacción
alérgica a los alérgenos es reducida o eliminada.

5 Otra forma posible de administración de los agentes
desensibilizantes consiste en aplicar a la mucosa nasal, co-
mo pulverización líquida o como polvo seco aspirado por la
nariz.

10 Todavía otra posible vía de administración es la aplica-
ción a la mucosa bucal, de nuevo como composición líquida
o seca.

15 Por consiguiente, esta invención incluye una composi-
ción farmacéutica adecuada para uso en la terapia de desensi-
bilización, que comprende un péptido o una sal farmacéutica-
mente aceptable de fórmula (I) junto con un vehículo farma-
céuticamente aceptable adecuado para administración parente-
ral, intranasal o bucal.

20 Una composición preferida de la invención es una vacu-
na desensibilizante.

Las composiciones de la invención pueden ser administra-
das de forma convencional para la terapia desensibilizante.

La preparación y propiedades de algunos de los péptidos
de esta invención están ilustradas en los siguientes ejemplos.

25 Los péptidos se sintetizan por métodos clásicos de la
síntesis de péptidos descritos en la bibliografía de la quí-
mica de los péptidos, por ejemplo mediante la clásica sínte-
sis en solución o síntesis de péptidos en fase sólida (SFPS)
o empleando una combinación de estos métodos.

30 Cuando sea apropiado los aminoácidos se refieren a la
configuración L salvo indicación en contrario y se utilizan

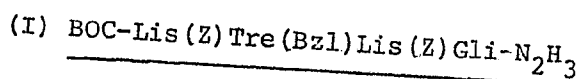
1	las siguientes abreviaturas:
	Boc Ter-butiloxicarbonilo
	Bzl Bencilo
	Z Benciloxicarbonilo (carbобензохи)
5	OTcP Ester 2,4,5-triclorofenílico
	DMF Dimetilformamida
	Et ₃ N Trietilamina
	DCCI Dicciclohexilcarbodiimida
	THP Tetrahidrofurano
10	OSu Ester de N-hidroxisuccinimida
	OBz Ester bencilico
	M.D.C. Dicloruro de metileno
	BAA Butanol/ácido acético/agua
	CHCl ₃ Cloroformo
15	MES Acido morfolinetilsulfónico
	EtAc Acetato de etilo
	MeOH Metanol
	EtOH Etanol
	-OMe Ester metílico
20	AcOH Acido acético
	HCl Acido clorhídrico
	CCF Cromatografía en capa fina
	p.f. Punto de fusión
25	Rf Relación de la distancia del producto a distancia del frente de disolvente desde el punto de aplicación
	C Número de gramos por 100 mililitros
	$[\alpha]_D^{25}$ Rotación específica a 25°C empleando luz de sodio (la línea D)
	RMN Resonancia magnética nuclear
30	TFA Acido trifluoracético
	p-Tsa p-Toluensulfonato

1 T.A. Temperatura ambiente

EJEMPLO 1

Preparación de LisTreLisGliSerGliPhePheOMe

5 El éster metílico del octapéptido se prepara mediante una estrategia de condensación de 4+4 fragmentos, siendo preparado un fragmento (I) por síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) (de acuerdo con el SPPS Manual por J.M. Stewart y J.D. Young Freeman and Company San Francisco, 1969) y el otro fragmento (II) por síntesis clásica en solución. Por combinación de I y II se obtiene el octapéptido (III) totalmente protegido que por desprotección da lugar al producto deseado (V).



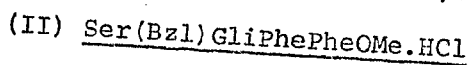
15 Este intermediario se prepara por SPPS, empleando procedimientos de copulación mediada por DCCI habituales, con una resina Merrifield sustituida con glicina a razón de 0,47 milimoles/g. El tetrapéptido-resina totalmente protegido se escinde por tratamiento con 100 equivalentes de hidrato de hidrazina en DMF a la temperatura ambiente durante 3 días. Mediante el tratamiento habitual se obtiene I con buen rendimiento. Así se cristaliza de etanol/agua y después de acetato de etilo; p.f. 132-134°C; CCF homogénea en CHCl₃:MeOH 9:1/mancha de I₂ con Rf 0,44; RMN concordante con la estructura;

20 $[\alpha]_D^{25} = -1,3^\circ (C = 1, DMF)$.

Análisis de aminoácidos:

Requerido: 1,00 Tre: 1,00 Gli: 2,00 Lis

Encontrado: 1,00 Tre: 1,05 Gli: 2,01 Lis.



30 El hidrocloreuro del éster metílico del tetrapéptido se prepara mediante síntesis en solución en 6 etapas.

1 (i) BOC-PhePheOMe:

Se copula BOC-Phe-OSu (5,25 g, 0,0145 moles) con PheOMe HCl (3,13 g, 0,0145 moles) en DMF (25 ml), en presencia de un equivalente de Et₃N (2,03 ml) a la temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se vierte en agua (250 ml) y el producto se extrae en EtAc (100 ml). Se aísla con un rendimiento del 81 % (5,00 g) y por cristalización de éter de petróleo (p.e. 80-100°C) da un p.f. de 123-124°C; $[\alpha]_D^{25} = -11,0^\circ$ (C = 1, DMF).

5
10 (ii) PhePheOMe.HCl:

El intermediario (i) (4,65 g) se BOC-desprotege empleando una solución de HCl 2N en EtAc (30 ml) durante 2 horas a la temperatura ambiente. El producto precipita de la solución con un rendimiento del 78 % (3,10 g) y tiene un p.f. de 205°C; $[\alpha]_D^{25} = 43,3^\circ$ (C = 1, AcOH).

15 (iii) BOC.GliPhePheOMe:

Se copula BOC.GliOSu (2,18 g, 0,008 moles) con (ii) (2,90 g, 0,008 moles) en DMF en presencia de un equivalente de Et₃N (1,2 ml) a la temperatura ambiente durante 3 días. Siguiendo un tratamiento similar al descrito para el aislamiento de (i), se obtiene el producto con un rendimiento del 67 % (2,60 g); p.f. 159-161°C después de cristalizarlo de EtAc (40 ml); $[\alpha]_D^{25} = -9,5^\circ$ (C = 1, DMF).

25 Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1,00 Gli:2,00 Phe

Encontrado: 1,00 Gli:2,02 Phe

(iv) GliPhePheOMe.HCl:

30 El intermediario (iii) (2,60 g) se BOC-desprotege de forma similar a la descrita para (ii). El producto se deposita como un aceite que se tritura con éter para dar un sólido

1 cristalino blanco con rendimiento casi cuantitativo. El material se purifica en una columna de Sephadex LH20, eluyendo con agua y tiene un p.f. de 196-199°C; CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1 presenta una mancha con I_2 a Rf 0,22.

5 Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1,00 Gli: 2,00 Phe

Encontrado: 1,00 Gli: 1,94 Phe.

(v) BOC.Ser(Bzl)GliPhePheOMe:

10 Se copula BOC.Ser(Bzl)OH (1,66 g, 0,0056 moles) con (iv) (2,36 g, 0,0056 moles) en MDC (20 ml) a 0°C, empleando DCCI (1,16 g, 0,0056 moles) y Et_3N (0,79 ml: 1 equivalente). La mezcla de reacción se agita a 0°C durante media hora y a la temperatura ambiente durante 2 horas, se filtra y el filtrado se evapora a vacío. Por cristalización del residuo de EtAc/éter de petróleo (80-100°C) se obtiene un rendimiento del 67 % (2,50 g) del producto, p.f. 163-167°C. CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1 (mancha de I_2) muestra el producto a Rf 0,68; $\{\alpha\}_D^{25} = -13,0^\circ$ (C = 1, DMF). El espectro de RMN concuerda con la estructura.

20 Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1,00 Ser: 1,00 Gli: 2,00 Me

Encontrado: 0,94 Ser: 1,12 Gli: 2,00 Phe.

(vi) Ser(Bzl)GliPhePheOMe.HCl (II):

25 El intermediario (v) (1,75 g) anterior se BOC-desprotege de forma similar a la descrita para (ii). Por adición de éter a la mezcla de reacción se obtiene el producto en forma de sólido con un rendimiento del 96 % (1,52 g), $\{\alpha\}_D^{25} = 21,0^\circ$ (C = 1, AcOH). Se purifica sobre Sephadex LH20, eluyendo con AcOH 1M, $\{\alpha\}_D^{25} = 21,0^\circ$ (C = 1, AcOH). El examen por CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1 (mancha de I_2) muestra el pro-

30

1 ducto (sal de acetato) como una mancha a Rf 0,27. El espectro de RMN concuerda con la estructura.

Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1,00 Ser: 1,00 Gli: 2,00 Phe

5 Encontrado: 1,00 Ser: 1,11 Gli: 1,92 Phe.

(III) BOC.Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliSer(Bzl)GliPhePheOMe

10 Se añade nitrito de ter-butilo (0,32 ml, 0,00266 moles) con intensa agitación a una solución de (I) (1,60 g; 0,00177 moles) en DMF (30 ml) que contiene 60 equivalentes de HCl 2N en THF (5,5 ml, 0,0011 moles) a -20°C. Al cabo de 30 minutos, se añade (II) (1,05 g, 0,00177 moles) en DMF (5 ml) con Et₃N (2,11 ml) suficiente para neutralizar todo el HCl presente y la mezcla de reacción se agita durante 18 horas a 4°C, se filtra y el filtrado se concentra a vacío. Por adición de agua fría se forma el producto que se obtiene con un rendimiento del 50 % (1,28 g) después de cristalizarlo de EtOH. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) es homogénea y presenta el producto a Rf 0,6, p.f. 202-203°C; $\{\alpha\}_D^{25} = -5,9^\circ$ (C = 1, DMF). El espectro de RMN concuerda con la estructura.

15

20

Análisis de aminoácidos:

Requerido : 2,00 Lis: 2,00 Phe: 2,00 Gli: 1,00 Tre:
1,00 Ser

25

Encontrado: 2,00 Lis: 1,94 Phe: 2,06 Gli: 0,99 Ser:
0,96 Tre

(IV) Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliSer(Bzl)GliPhePheOMe.HCl

30

El octapéptido totalmente protegido (II) (1,20 g) es BOC-desprotegido en solución de HCl 2N en una mezcla disolvente de DMF/EtAc 6:14 (20 ml). Se utiliza un periodo de reacción prolongado de 4 horas a la temperatura ambiente y

1

por adición de éter se deposita el producto. Por recristalización de MeOH/éter se obtiene el producto con un rendimiento del 52 % (0,60 g). La CCF en CHCl_3 :MeOH 9:1 (mancha de I_2) presenta una mancha principal a R_f 0,4; $[\alpha]_D^{25} = 10,1^\circ$ (C = 1, ACOH).

5

Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1,00 Tre: 1,00 Ser: 2,00 Gli: 2,00 Phe:
2,00 Lis

Encontrado: 1,00 Tre: 1,00 Ser: 2,17 Gli: 2,19 Phe:
2,32 Lis

10

(V) LisTreLisGliSerGliPhePheOMe

15

El octapéptido parcialmente protegido (IV) (0,10 g) se hidrogena en ACOH al 85 % (70 ml) con catalizador de paladio al 10 % en carbón (0,20 g) sobre una corriente continua de hidrógeno durante 20 horas. Se filtra la mezcla, se evapora a vacío y el residuo se filtra sobre Sephadex LH20, eluyendo con agua para dar el éster metílico del octapéptido deseadó(V) (0,03 g, rendimiento 46 %). El examen por CCF muestra una mancha a R_f 0,2 en BAA 5:2:2 (t-BuOCl/mancha de KI-almidón) y R_f 0,5 en BAA 5:2:3 (mancha de ninhidrina).

20

Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1,00 Ser: 1,00 Tre: 2,00 Gli: 2,00 Phe:
2,00 Lis

Encontrado: 1,00 Ser: 1,03 Tre: 2,02 Gli: 2,06 Phe:
1,98 Lis.

25

El examen isotacoforético muestra una banda en una cantidad superior al 95 % (electrolito inicial KOH 10 mM + MES pH 6,0 y electrolito final β -alanina 10 mM y HCl pH 4,23). El espectro de RMN 80 HzFT concuerda con la estructura.

30

EJEMPLO 2

Preparación de ArgLisTreLisGliSerGliPhePheOMe

Este nonapéptido se prepara por copulación de (IV) con Z-Arg(Z)₂OSu, seguido de hidrogenolisis del nonapéptido totalmente protegido resultante.

(i) Z-Arg(Z)₂Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliSer(Bzl)GliPhePheOMe:

Al octapéptido (IV) (0,344 g, 0,30025 moles) en DMF (3 ml) a 0°C se añade (1 equivalente) Et₃N (0,025 g en 1 ml de DMF) y Z-Arg(Z)₂OSu (0,17 g, 0,00025M en 2 ml de DMF). La solución se deja a 4°C durante 65 horas, se diluye con agua (8 ml) y el producto depositado se separa por filtración y se seca (0,37 g, rendimiento 78 %). Por cristalización de DMF/EtOH se obtiene el producto con un p.f. de 204-210°C (descomposición). El examen por CCF en CHCl₃:MeCH 9:1 (mancha de I₂) muestra por visualización U.V. una mancha a Rf 0,69. El espectro de RMN concuerda con la estructura.

Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1,00 Tre: 1,00 Ser: 2,00 Gli: 2,00 Phe:
2,00 Lis: 1,00 Arg.
Encontrado: 1,00 Tre: 1,00 Ser: 2,10 Gli: 2,01 Phe:
2,04 Lis: 1,04 Arg.

(ii) ArgLisTreLisGliSerGliPhePheOMe:

El nonapéptido totalmente protegido (i) (0,07 g) se disuelve en una cantidad mínima de DMF y se añaden 5 volúmenes de AcOH. La mezcla se hidrogena en presencia de catalizador de paladio al 10 % en carbón (2,5 veces el peso del compuesto) durante 19 horas a la temperatura ambiente, empleando una corriente continua de hidrógeno. Se agrega agua para formar una solución acuosa al 15 % y la mezcla se hidrogena durante 3 horas más. Por filtración y evaporación a

1 vacío a 45°C se obtiene el producto en forma de sólido ví-
 5 treo. La purificación se realiza en una columna de Sephadex
 LH20, eluyendo con AcOH 1M y el producto se aísla con un
 rendimiento del 26 % (0,018 g). La CCF en BAA 5:3:5 (mancha
 de ninhidrina) muestra el producto a Rf 0,34.

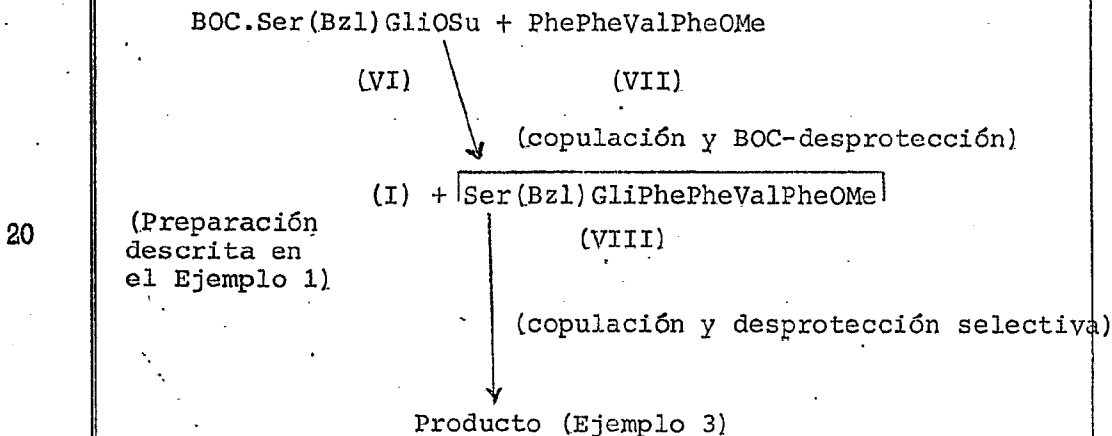
Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1,00 Tre: 1,00 Ser: 2,00 Gli: 2,00 Phe:
 2,00 Lis: 1,00 Arg
 Encontrado: 1,00 Tre: 1,01 Ser: 2,07 Gli: 2,00 Phe:
 10 2,07 Lis: 1,00 Arg.

EJEMPLO 3

Preparación de LisTreLisGliSerGliPhePheValPheOMe

15 El éster metílico del decapeptido se sintetiza median-
 te una estrategia de condensación de 4 + 2 + 4 fragmentos
 como sigue:



25 (VI) BOC.Ser(Bzl)GliOSu

Se prepara en tres etapas:

(i) BOC.Ser(Bzl)GliOMe:

30 Se copula BOC.Ser(Bzl)OH (5,0 g, 0,017 moles) a GliOMeNCI
 (2,13 g, 0,017 moles) en MDC (100 ml) a la temperatura ambien-
 te durante 3,5 horas, en presencia de un equivalente de Et₃N
 y empleando DCCI (3,5 g, 0,017 moles) como agente condensan-

1 te. El precipitado se separa por filtración y la solución
se lava dos veces con agua, bicarbonato sódico acuoso y agua
se seca y se evapora a vacío para dar un aceite (7,1 g). La
CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1 (mancha de I_2) muestra una mancha a
5 Rf 0,64; $[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = 4,7^\circ$ (C = 1, MeOH).

(ii) BOC.Ser(Bzl)GliOH:

El compuesto (i) anterior (7,0 g) se disuelve en dioxano (25 ml) y se trata con un volumen igual de NaOH 1N (25 ml) y la solución se agita durante media hora a la temperatura ambiente. Se añade HCl 1N (25 ml) hasta un ligero exceso y el aceite que se forma se extrae en EtAc. La capa orgánica se retroextrae en NaHCO_3 y se acidula a pH 3,8 con ácido cítrico al 20 %, se extrae con EtAc, se lava la capa orgánica con agua y salmuera, se seca y se evapora para dar un producto en forma de jarabe (4,0 g). La CCF en $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$ 1:1 (mancha de I_2) muestra el producto a Rf 0,59. El espectro de RMN concuerda con la estructura.

(iii) BOC.Ser(Bzl)GliOSu:

El compuesto (ii) anterior (4 g, 0,01135 moles) se trata con HOSu (1,3 g, 0,011 moles) y DCCI (2,34 g, 0,011 moles) en dioxano (50 ml) a la temperatura ambiente durante la noche. El precipitado que se forma se separa por filtración, se elimina el disolvente y el producto se cristaliza de IPA (100 ml) con un rendimiento del 59 % (3,00 g). La CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1 (mancha de I_2) presenta una mancha principal a Rf 0,57; P.f. 132-134°C; $[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = -1,8^\circ$ (C = 1, MeOH).

(VII) PhePheValPheOMe

Se prepara en seis etapas:

(i) BOC.ValPheOMe:

Se copula BOC.ValOSu (10,0 g, 0,0328 moles) con

1 PheOMe.HCl (6,85 g, 0,0318 moles) en 2,00 ml de tolueno, a
la temperatura ambiente durante la noche y en presencia de
Et₃N (1 equivalente). Se filtra la mezcla y el filtrado se
5 lava con HCl 1N y solución saturada de NaCl, se seca y se
evapora a vacío para dar el producto (11,31 g) en forma de
compuesto cristalino blanco con un rendimiento del 94 %.
La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) presenta una mancha
a Rf 0,67; $\{\alpha\}_D^{25} = -27,4^\circ$ (C = 1, MeOH).

(ii) ValPheOMe.HCl:

10 El compuesto (i) (9,25 g) es BOC-desprotegido en HCl
2N en EtAc (100 ml), durante 24 horas a la temperatura
ambiente, con lo que el producto precipita. La mezcla se diluye
con EtAc seco y el producto se separa por filtración con
un rendimiento del 78 % (6,0 g). El producto se purifica
15 finalmente sobre Sephadex LH20, p.f. 193-193,5°; la CCF
en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf
0,60; $\{\alpha\}_D^{25} = 73,3^\circ$ (C = 1, AcOH).

(iii) BOC.PheValPheOMe:

20 El compuesto (ii) (5,34 g, 0,017 moles) se copula con
BOC.PheOSu (6,15 g, 0,017 moles) en DMF al 25 % en tolueno
(250 ml), a la temperatura ambiente durante 65 horas en pre-
sencia de Et₃N (1 equivalente). Después la mezcla se fil-
tra, se separa el disolvente a vacío y el jarabe se enfría
con agua. El precipitado blanco (8,5 g) se separa por fil-
25 tración y se recristaliza de EtAc/éter de petróleo (80-100°);
rendimiento 80 %. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂)
muestra una mancha a Rf 0,69; $\{\alpha\}_D^{25} = -31,0^\circ$ (C = 1, MeOH).
El espectro de RMN concuerda con la estructura.

(iv) PheValPheOMe.HCl:

30 El compuesto (iii) (6,87 g) es BOC-desprotegido en

1 HCl 2N en EtAc. (100 ml) durante 2 horas a la temperatura
ambiente, con lo que precipita un sólido blanco (5,84 g)
que representa un rendimiento del 97 % del producto, p.f.
243-245° (descomposición). La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha
5 de I₂) muestra una mancha a Rf 0,59; $[\alpha]_D^{25} = 8,8^\circ$ (C = 1,
AcOH).

(v) BOC.PhePheValPheOMe:

10 Se copula BOC.PheOSu (4,30 g, 0,0119 moles) con el com-
puesto (iv) (5,5 g, 0,0119 moles) en tolueno (100 ml) a la
temperatura ambiente durante 65 horas, en presencia de DMF
suficiente para producir la disolución y Et₃N (1 equivalen-
te). El disolvente se evapora a vacío y el jarabe se enfría
con agua y el producto se separa por filtración. Después
15 el producto se tritura con etanol caliente, se enfría y se
recoge (6,38 g, rendimiento 80 %), p.f. 218-219°C. La CCF
en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf
0,62; $[\alpha]_D^{22} = -15,9^\circ$ (C = 1, DMF). El espectro de RMN con-
cuerda con la estructura.

20 (vi) PhePheValPheOMe.Tfa:

El compuesto (v) (5 g) es BOC-desprotegido en TFA (25
ml) a 0°C durante media hora y a la temperatura ambiente du-
rante media hora. Después la solución se enfría con éter
(75 ml) y el producto se separa por filtración (4,48 g, ren-
dimiento 88 %), p.f. 224-226° (descomposición). La CCF en
25 CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,49;
 $[\alpha]_D^{25} = 10,6$ (C = 1, AcOH). El espectro de RMN concuerda con
la estructura.

(VIII) Ser(Bzl)GliPhePheValPheOMe

Se prepara en dos etapas:

30 (i) BOC.Ser(Bzl)GliPhePheValPheOMe:

1 Se copula el intermediario VI (2,37 g; 0,00528 moles)
con el intermediario VII (3,62 g, 0,00528 moles) en tolueno
5 (500 ml) durante la noche, a la temperatura ambiente y en
presencia de Et₃N (0,74 ml, 0,00528 moles). La mezcla se lava
con agua y el disolvente se evapora a vacío. El sólido
obtenido se tritura con agua, se seca y se recristaliza de
EtOH (4,42 g, rendimiento 93 %). La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1
(mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,61; $[\alpha]_D^{25^\circ} = -13,5^\circ$
(C = 1, DMF). El espectro de RMN concuerda con la estruc-
tura.

10 (ii) Ser(Bzl)GliPhePheValPheOMe:

El compuesto (i) (2,8 g) es BOC-desprotegido en TFA
(30 ml) durante 40 minutos a 0°C. La solución se enfría
con éter (200 ml) y el producto precipitado se obtiene con
15 rendimiento cuantitativo. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha
de I₂) muestra una mancha a Rf 0,2; p.f. 214-216°C (descom-
posición); $[\alpha]_D^{25^\circ} = 3,7^\circ$ (C = 1, AcOH). El espectro de RMN
concuerda con la estructura.

20 BOC.Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliSer(Bzl)GliPhePheValPheOMe

El péptido I (2,25 g) (véase el Ejemplo 1) se copula
con VIII (2,19 g) mediante la modificación de Henzyl-Ru-
dinger del método de la azida, como se ha descrito anterior-
mente para el octapéptido. El producto se recristaliza de
EtOH y se obtiene con un rendimiento del 61 % (2,5 g), p.f.
25 243-244°.

Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1Tre: 1Ser: 2Gli: 1Val: 3Phe: 2Lis

Encontrado: 1,13Tre: 1,11Ser: 2,15Gli: 1,00Val: 3,04Phe:
1,98Lis.

30 $[\alpha]_D^{25^\circ} = -7,5^\circ$ (C = 1, DMF). El espectro de RMN concuerda

1

da con la estructura.

LisTreLisGliSerGliPhePheValPheOMe

5

El intermediario anterior (0,18 g) es BOC-, Z- y Bzl-
 desprotegido por tratamiento con HBr al 33 % en dioxano
 (5 ml) a la temperatura ambiente durante una hora, con lo
 que se forma un precipitado. Después se añaden HBr/dioxano
 adicional (5 ml) y agua (1 ml) para efectuar la disolución
 y se prosigue la reacción durante media hora más. A conti-
 nuación se añaden 50 ml de acetona y la solución se enfría
 con éter (100 ml). El líquido que sobrenada se decanta y
 el sólido se disuelve en agua (7 ml) y se liofiliza para
 dar 0,145 g del producto en forma de la sal trihidrobromuro.

10

Análisis de aminoácidos:

Requerido : 1Tre: 1Ser: 2Gli: 1Val: 3Phe: 2Lis

15

Encontrado: 1,05Tre: 1,00Ser: 2,14Gli: 1,02Val: 3,13Phe:
 2,00Lis.

Una parte alícuota del producto se purifica sobre
 Sephadex LH20 eluyendo con agua hasta obtener un material
 de una sola mancha con una Rf de 0,384 (BAA 5:2:2, rociada
 con ninhidrina).

20

EJEMPLO 4

Preparación de LisTreLisGliSerGliPhePheVal.PheOH

El decapeptido en forma de ácido libre se sintetiza
 mediante una estrategia de condensación de 4 + 2 + 4 fragmen-
 tos como sigue:

25

BOC.Ser(Bzl)GliOSu + PhePheValPheOBz

(VI: preparación
como en el Ejemplo 3)

(IX)

(copulación y BOC-desprotección)

30

1 sencia de Et_3N (1 equivalente). La mezcla se vierte en agua
de hielo y el precipitado blanco resultante (20,0 g) se se-
para por filtración y se recristaliza de EtAc/éter de petró-
leo (40-60°); rendimiento 85 %; p.f. 160-162°. La CCF en
5 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1 (mancha de I_2) muestra una mancha a R_f 0,72;
 $[\alpha]_D^{25^\circ} = -36,0^\circ$ ($C = 1$, MeOH).

(iv) PheValPheOBz.HCl:

10 El compuesto (iii) (20,0 g, 0,033 moles) es BOC-despro-
tegido en HCl 2N en EtAc (240 ml) durante 2 horas a la
temperatura ambiente, formándose un precipitado sólido
(15,23 g) que representa un rendimiento del 85 % del pro-
ducto, p.f. 228-229° (descomposición). La CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$
9:1 (mancha de I_2) muestra una mancha a R_f 0,63; $[\alpha]_D^{25^\circ} = -6,9^\circ$
($C = 1$, AcOH).

15 (v) BOC.PhePheValPheOBz:

20 Se copula BOC.PheOSu (10,26 g, 0,0283 moles) con un
compuesto (iv) (15,23 g, 0,0283 moles) en dioxano al 50 %
en DMF (250 ml) a la temperatura ambiente durante 4 horas,
en presencia de Et_3N (1 equivalente). La mezcla se vierte en
agua de hielo y el precipitado blanco resultante se separa
por filtración y se recristaliza de EtAc/éter de petróleo
(40-60°) con rendimiento cuantitativo (21,41 g), p.f. 191-
193°. La CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1 (mancha de I_2) muestra una
mancha a R_f 0,72; $[\alpha]_D^{25^\circ} = 12,8^\circ$ ($C = 1$, DMF).

25 (vi) PhePheValPheOBz.HCl:

30 El compuesto (v) (21,15 g, 0,028 moles) es BOC-despro-
tegido en HCl 2N en EtAc (500 ml) durante 2 horas a la tempe-
ratura ambiente. El producto (17,9 g) precipita con un ren-
dimiento del 92 % por adición de éter seco; p.f. 242° (descom-
posición). La CCF en $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 9:1 (mancha de I_2) muestra

1 una mancha a Rf 0,74; $[\alpha]_D^{25^\circ} = -5,9^\circ$ (C = 1, AcOH). El espectro de RMN concuerda con la estructura.

(X) Ser(Bzl)GliPhePheValPheOBz

Se prepara en dos etapas:

5 (i) BOC.Ser(Bzl)GliPhePheValPheOBz:

Se copula el intermediario (VI) (4,49 g, 0,010 moles) con el intermediario (IX) (6,85 g, 0,010 moles) en DMF al 35 % en dioxano (75 ml) a la temperatura ambiente durante 4 horas, en presencia de Et₃N. (1 equivalente). La mezcla se vierte en agua de hielo y el producto precipitado (9,39 g) se recristaliza de metanol con un rendimiento del 91 %; p.f. 226-228°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,74; $[\alpha]_D^{25^\circ} = -13,0^\circ$ (C = 1, DMF). El RMN F.T. 'H concuerda con la estructura.

15 (ii) Ser(Bzl)GliPhePheValPheOBz.HCl:

El compuesto (i) (5,0 g, 0,0051 moles) es BOC-desprotegido en HCl 2N en EtAc (150 ml) durante 2 horas a la temperatura ambiente. El producto (4,42 g) precipita con un rendimiento del 94 % por adición de éter seco; p.f. 232-234° (descomposición). La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,44; $[\alpha]_D^{25^\circ} = -4,3^\circ$ (C = 1, AcOH). El RMN concuerda con la estructura.

20 (XI) ZLis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOTcp

Se prepara en siete etapas:

25 (i) BOC.Lis(Z)GliOMe:

Se copula BOC.Lis(Z)OSu (23,85 g, 0,050 moles) con GliOMe.HCl (6,25 g, 0,050 moles) en dioxano al 50 % en DMF, a la temperatura ambiente durante 4,5 horas, en presencia de un equivalente de Et₃N. La mezcla de reacción se evapora a vacío y el residuo se disuelve en EtAc. La solución se lava,

30

1 se seca, se filtra y evapora hasta un aceite incoloro que solidifica al permanecer en reposo con un rendimiento del 89 %. La CCF en CHCl_3 :MeOH 9:1 (muestra de I_2) presenta una mancha a R_f 0,54.

5 (ii) Lis(Z)GliOMe.HCl:

El compuesto (i) (20,00 g, 0,0443 moles) es BOC-desprotegido en HCl 2N en EtAc (250 ml) durante 2 horas a la temperatura ambiente, cuando precipita el producto. La mezcla se diluye con éter seco y el producto se separa por filtración con un rendimiento del 96 % (15,67 g); p.f. 158-159°. La CCF en EtAc (mancha de I_2) muestra una mancha a R_f 0,52.

10

(iii) BOC.Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe:

15 Se copula BOC.Tre(Bzl)OH (6,18 g, 0,020 moles) con el compuesto (ii) (7,76 g, 0,020 moles) en DMF al 30 % en dioxano (75 ml) en agua de hielo durante una hora y después a la temperatura ambiente durante 2 horas más, en presencia de DCCI (1 equivalente) y Et_3N (1 equivalente). Se filtra la mezcla de reacción, se evapora a vacío y el residuo se purifica por cromatografía en columna de sílice eluyendo con cloroformo. El producto se aísla como sólido incoloro con un rendimiento del 49 %, p.f. 135-136°. La CCF en CHCl_3 :MeOH 9:1 (mancha de I_2) muestra una mancha a R_f 0,57. El RMN F.T. ^{13}C concuerda con la estructura.

15

20

(iv) Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe.HCl:

25 El compuesto (iii) (3,48 g, 0,0054 moles) es BOC-desprotegido en HCl 2N en EtAc (100 ml) durante 2 horas a la temperatura ambiente. El producto (2,88 g) precipita con un rendimiento del 91 % por adición de éter seco; p.f. 100-101°. La CCF en CHCl_3 :MeOH 9:1 (mancha de I_2) muestra una mancha a R_f 0,52. $[\alpha]_D^{25} = -13,5^\circ$ (C = 1, AcOH).

30

1 (v) ZLis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe:

5 | Se copula ZLis(Z)OTcp (1,80 g, 0,003 moles) con el com-
puesto (iv) (1,72 g, 0,003 moles) en dioxano (45 ml) a la
temperatura ambiente durante 4 horas, en presencia de Et₃N
(1 equivalente). El producto se separa por filtración, se
lava con agua y se seca a vacío (1,36 g, rendimiento 50 %);
p.f. 185-188°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) mues-
tra una mancha a Rf 0,76.

10 (vi) ZLis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOH:

15 Una solución del compuesto (v) (0,92 g, 0,001 moles)
en DMF al 50 % en metanol se trata con solución de NaOH 1N
(2,5 ml) y se agita a la temperatura ambiente durante 1 ho-
ra. Después de acidular, el producto precipitado (0,45 g)
se recristaliza de metanol con un rendimiento del 49 %; p.f.
171-173°. La CCF en CHCl₃:MeOH 2:1 (cloroformiato de ter-bu-
tilo/rociada de NaI-almidón) muestra una mancha a Rf 0,50;
{α}_D^{25°} = -5,4° (C = 1, AcOH). El RMN F.T. ¹³C concuerda con
la estructura.

20 (vii) ZLis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOTcp:

25 Una solución de TcpOH (0,10 g, 0,0005 moles) y com-
puesto (vi) (0,46 g, 0,0005 moles) en DMF se trata con DCCI
(0,11 g, 0,0005 moles) y se agita a 5° durante una hora y
después a la temperatura ambiente durante la noche. Se filtra
la mezcla de reacción y el producto (0,60 g) se aísla como
sólido frágil por evaporación a vacío; p.f. 176-178°. La
CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a
Rf 0,71; {α}_D^{25°} = -6,0° (C = 1, AcOH).

ZLis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliSer(Bzl)GliPhePheValPheOBz

30 . El péptido (XI) (0,55 g, 0,0005 moles) se copula con
el compuesto (X) (0,46 g, 0,0005 moles) en DMF a la tempera-

1 tura ambiente durante 4 horas, en presencia de Et₃N (1 equi-
valente). La mezcla de reacción se vierte en agua de hielo
y el precipitado resultante se separa por filtración y se
seca a vacío. Mediante purificación por cromatografía en co-
5 lumna de sílice, eluyendo con CHCl₃, se obtiene el producto
(0,92 g) con un rendimiento del 85 %. La CCF en CHCl₃:MeOH
9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,34. El RMN F.T.
13C concuerda con la estructura.

LisTreLisGliSerGliPhePheValPheOH

10 El intermediario anterior (0,76 g, 0,0003 moles) es
desprotegido por hidrogenación continua en ácido acético al
85 % con HCl 1N (1 milimol) durante 18 horas, en presencia
de paladio al 10 % en carbón (0,80 g). El producto se puri-
fica en una columna de Biogel P2 eluyendo con acetato amóni-
15 co 1M y posteriormente en una columna de celulosa CM32 elu-
yendo con acetato amónico 0,1M, a pH 5. El aislamiento final
del producto con un rendimiento del 23 % se realiza por lio-
filización. La CCF en butanol/ácido acético/agua (5:2:2)
(rociada con ninhidrina) muestra una mancha a Rf 0,22.

20

Análisis de aminoácidos:

Requerido : 2Lis: 1Tre: 2Gli: 1Ser: 3Phe: 1Val

Encontrado: 1,80Lis: 0,92 Tre: 2,00Gli: 1,07Ser: 3,24Phe:
0,91Val.

EJEMPLO 5

25

Preparación de ProArgLisTreLisGliSerGliPhePheOMe

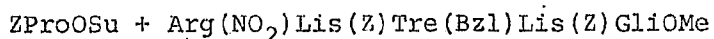
Este decapeptido se sintetiza mediante una estrategia
de condensación de 1 + 1 + 4 + 4 fragmentos como sigue:

BOC.Arg(NO₂)OSu + Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe

(XII)

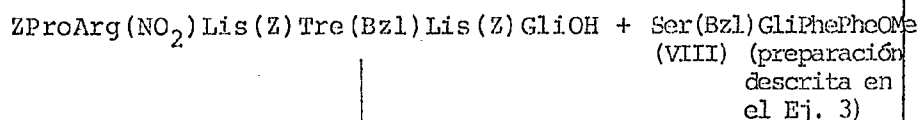
30

↓
copulación y BOC-desprotección



(XIII)

(copulación e hidrólisis)



copulación y desprotección completa

10 Producto (Ejemplo 5)

(XII) Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe

Se prepara en dos etapas a partir de Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe descrito en el Ejemplo 4.

15 (i) BOC.Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe:

Se copula BOC.Lis(Z)OSu (2,38 g, 0,005 moles) con Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe.HCl (2,87 g, 0,005 moles) en dioxano (60 ml) a la temperatura ambiente durante 4 horas, en presencia de Et₃N (1 equivalente). La mezcla de reacción se vierte en agua de hielo para dar el producto requerido (3,80 g) como sólido blanco cristalino con un rendimiento del 84 %; p.f. 103-105°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a R_f 0,55; $[\alpha]_D^{25} = -10,4^\circ$ (C = 1, AcOH).

20 (ii) Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe.HCl:

25 El compuesto (i) (3,80 g, 0,0042 moles) es BOC-desprotegido con HCl 2N en EtAc (100 ml) durante 2 horas a la temperatura ambiente. El producto (3,30 g) precipita con un rendimiento del 93 % por adición de éter seco; p.f. 184-186°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a R_f 0,30; $[\alpha]_D^{25} = 5,6^\circ$ (C = 1, AcOH).

30

1 (XIII). Arg(NO₂)Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe

Se prepara en dos etapas:

(i). BOC.Arg(NO₂)Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe:

5 Se copula BOC.Arg(NO₂)OSu (1,40 g, 0,0033 moles) con el compuesto (XII) (3,30 g, 0,004 moles) en DMF al 10 % en dioxano (55 ml), a la temperatura ambiente durante 3 horas, en presencia de Et₃N. (1 equivalente). El compuesto (XII) que no ha reaccionado se separa por filtración y la mezcla de reacción se vierte en agua de hielo, se extrae con EtAc para dar el producto (2,60 g) que se recristaliza de IPA con un rendimiento del 71 %, p.f. 133-135°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,42. $[\alpha]_D^{25} = -6,7^\circ$ (C = 1, AcOH).

10 (ii). Arg(NO₂)Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe.HCl:

15 El compuesto (i) (2,0 g, 0,0018 moles) es BOC-desprotegido en HCl 2N en EtAc (50 ml) durante 2 horas a la temperatura ambiente. El producto (1,75 g) es precipitado con un rendimiento del 92 % por adición de éter seco; p.f. 157° (descomposición). La CCF en CHCl₃:MeOH 2:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,53; $[\alpha]_D^{25} = -5,6^\circ$ (C = 1, MeOH).

20 (XIV). ZProArg(NO₂)Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOH

Se prepara en dos etapas:

25 (i). ZProArg(NO₂)Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe:

30 Se copula ZProOSu (0,57 g, 0,0016 moles) con el compuesto (XIII) (1,71 g, 0,0016 moles) en DMF al 20 % en dioxano (30 ml) a la temperatura ambiente durante 2 horas, en presencia de Et₃N (1 equivalente). La mezcla de reacción se vierte en agua de hielo y se extrae con EtAc para dar el producto (1,11 g) con un rendimiento del 54 %. La CCF en CHCl₃:

1 MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,36.

(ii) ZProArg(NO₂)Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOH:

5 Una solución del compuesto (i) (0,87 g, 0,0007 moles) en DMF al 50 % en metanol (30 ml) se trata con una solución de NaOH 1N (1,7 ml) y se agita a la temperatura ambiente durante 2 horas. Por acidulación precipita el producto (0,43 g) con un rendimiento del 50 %. La CCF en CHCl₃:MeOH 2:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,77; $[\alpha]_D^{25} = -4,1^\circ$ (C = 1, AcOH). El RMN concuerda con la estructura.

10 ZProArg(NO₂)Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliSer(Bzl)GliPhePheOMe

15 Se copula el péptido(XIV) (0,40 g, 0,0033 moles) con el compuesto (VIII) (0,20 g, 0,0034 moles) en DMF (5 ml), en presencia de Et₃N (1 equivalente), DCCI (0,07 g, 0,0035 moles) e hidroxibenzotriazol (0,044 g, 0,0035 moles), a 5° durante una hora y después a la temperatura ambiente durante una hora. La urea precipitada se separa por filtración y el producto requerido (0,50 g) se aísla vertiendo la mezcla de reacción en agua de hielo y aislando por filtración, con un rendimiento del 88 %. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,52. El RMN concuerda con la estructura.

20 ProArgLisTreLisGliSerGliPhePheOMe

25 El intermediario anterior (0,40 g, 0,0022 moles) se desprotege por hidrogenación continua en ácido acético al 85 % durante 18 horas, en presencia de catalizador de paladio al 10 % en carbón (0,40 g). El producto se purifica en una columna de Biogel P2 eluyendo con agua y posteriormente en una columna de Sephadex LH20, de nuevo eluyendo con agua. El aislamiento final del producto con un rendimiento del 34 % se realiza por liofilización. La CCL en butanol/ácido

30

1 acético/agua (5:2:2) (rociada de ninhidrina) presenta una
mancha a Rf 0,34.

Análisis de aminoácidos:

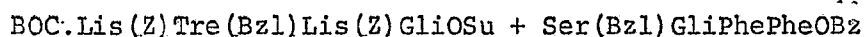
Requerido : 1Pro: 1Arg: 2Lis: 1Tre: 2Gli: 1Ser: 2 Phe

5 Encontrado: 0,95Pro: 0,99Arg: 1,88Lis: 1,00Tre: 2,00Gli:
1,01Ser: 1,96Phe.

EJEMPLO 6

Preparación de LisTreLisGliSerGliPhePheOH

10 El octapéptido en forma de ácido libre se sintetiza
mediante una estrategia de condensación de 4 + 4 fragmentos
como sigue:



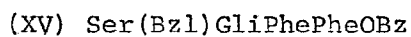
(XVI)

(XV)

(copulación y desprotección
completa)

15

↓
Producto (Ejemplo 6)



Se prepara en seis etapas:

20 (i) BOC.PhePheOBz:

Se copula BOC.PheOH (11,88 g, 0,045 moles) con PheOBz.
pTsa (19,4 g, 0,045 moles) en MDC (200 ml) a 0° durante una
hora y después a la temperatura ambiente durante la noche,
en presencia de Et₃N (1 equivalente) y DCCI (1 equivalente).
25 Se filtra la mezcla de reacción y el producto (14,92 g) se
aisla con un rendimiento del 64 % por evaporación a vacío y
recristalización de EtOAc/éter de petróleo (80-100°) (14,92
g); p.f. 123,5-124,5°. CCF en EtAc:éter de petróleo (80-100°
1:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,68; $[\alpha]_D^{25} =$
30 -16,7° (C = 1, MeOH).

1 (ii) PhePheOBz.Tfa:

El compuesto (i) (14,0 g, 0,028 moles) es BOC-desprotegido en Tfa al 50 % en MDC (100 ml) durante media hora a 0°. La solución se enfría con éter seco y el producto
5 (14,23 g) se separa por filtración con rendimiento cuantitativo; p.f. 180° (descomposición). La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,73; $[\alpha]_D^{25} = 17,5^\circ$ (C = 1, AcOH).

10 (iii) BOC.GliPhePheOBz:

Se copula BOC.GliOSu (9,6 g, 0,0353 moles) con el compuesto (ii) (18,20 g, 0,0353 moles) en tolueno, MDC y DMF (125 ml) a la temperatura ambiente durante la noche, en presencia de Et₃N (1 equivalente). La mezcla de reacción se evapora a presión reducida y el residuo resultante se disuelve
15 en EtAc, se lava, se seca y evapora a vacío para dar un sólido cristalino (19,71 g) con rendimiento cuantitativo; p.f. 127-130°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,81; $[\alpha]_D^{25} = -17,4^\circ$ (C = 1, MeOH).

20 (iv) GliPhePheOBz.Tfa:

El compuesto (iii) (19,3 g, 0,0346 moles) es BOC-desprotegido en Tfa al 50 % en MDC (130 ml) durante hora y media a 0°. La solución se enfría con éter y el producto
25 (17,79 g) se separa por filtración con un rendimiento del 90 %. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una sola mancha a Rf 0,35; $[\alpha]_D^{25} = 6,0^\circ$ (C = 1, AcOH).

30 (v) BOC.Ser(Bzl)GliPhePheOBz:

Se copula BOC.Ser(Bzl)OSu (11,03 g, 0,0282 moles) con un compuesto (iv) (16,13 g, 0,0282 moles) en DMF al 15 % en tolueno (350 ml) a la temperatura ambiente durante la noche, en presencia de Et₃N (1 equivalente). La mezcla de

1 reacción se evapora a presión reducida y el residuo resul-
tante se disuelve en EtAc, se lava, se seca y se evapora a
vacío para dar el producto (14,88 g) con un rendimiento del
72 % por recristalización de EtAc/éter de petróleo; p.f.
5 149-151°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra
una sola mancha a Rf 0,65; $[\alpha]_D^{25} = -11,2^\circ$ (C = 1, MeOH).

(vi) Ser(Bzl)GliPhePheOBz:

El compuesto (v) (14,45 g, 0,0196 moles) es BOC-des-
protegido en Tfa al 50 % en MDC (140 ml) durante una hora a
10 0°. La solución se enfría con éter y el producto (13,1 g)
se separa por filtración con un rendimiento del 89 %; p.f.
185-187° (descomposición). La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha
de I₂) muestra una mancha a Rf 0,43; $[\alpha]_D^{25} = 10,1^\circ$ (C = 1,
AcOH).

15 (XVI) BOC.Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOSu

Se prepara en cuatro etapas a partir de BOC.Tre(Bzl)-
Lis(Z)GliOMe descrito en el Ejemplo 5.

(i) Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe.Tfa:

El BOC.Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe (2,87 g, 0,0045 moles)
20 es BOC-desprotegido en Tfa al 50 % en MDC (50 ml) durante
una hora a 0°. La solución se apaga con éter y el producto
(2,10 g) se separa por filtración con un rendimiento del
72 %. CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una man-
cha a Rf 0,26.

25 (ii) BOC.Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOMe:

Se copula BOC.Lis(Z)OSu (2,00 g, 0,003 moles), con un
compuesto (i) (1,45 g, 0,003 moles) en DMF al 10 % en tolu-
eno, a la temperatura ambiente durante la noche. La mezcla
de reacción se evapora a presión reducida y el residuo re-
sultante se disuelve en EtAc, se lava, se seca y se evapora
30

1 a vacío para dar el producto (2,04 g) con un rendimiento del 74 % por recristalización de EtAc/éter de petróleo; p.f. 117-119°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,60.

5 (iii) BOC.Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOH:

Una solución del compuesto (ii) (1,98 g, 0,0022 moles) en DMSO (30 ml) se trata con una solución de NaOH 1N (1,5 equivalentes) y se agita a la temperatura ambiente durante 1 hora. Por acidulación se obtiene el producto (1,82 g) con rendimiento cuantitativo. La CCF en CHCl₃:MeOH 5:1 (mancha de I₂) muestra el compuesto inmediatamente por encima de la vaselina.

10 (iv) BOC.Lis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliOSu:

15 Se copula HOSu (0,24 g, 0,002 moles) con el compuesto (iii) (1,82 g, 0,002 moles) en dioxano (25 ml) a la temperatura ambiente durante 4 horas, en presencia de DCCI (1 equivalente). La mezcla de reacción se filtra y el filtrado se evapora a presión reducida. Por recristalización del residuo de EtOH se obtiene el producto (0,30 g) con un rendimiento del 15 %; p.f. 118-122°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha de I₂) muestra una mancha a Rf 0,50; $[\alpha]_D^{25} = -4,0^\circ$ (C = 1, DMF). El RMN concuerda con la estructura.

20 BOCLis(Z)Tre(Bzl)Lis(Z)GliSer(Bzl)GliPhePheOBz

25 El péptido (XVI) (0,22 g, 0,0023 moles) se copula con el compuesto (XV) (0,17 g, 0,0023 moles) en DMF al 5 % en tolueno (21 ml), a la temperatura ambiente durante la noche en presencia de Et₃N (1 equivalente). La mezcla de reacción se evapora a presión reducida y el residuo se recristaliza de EtOH para dar un producto (0,29 g) con un rendimiento del 85 %; p.f. 195-199°. La CCF en CHCl₃:MeOH 9:1 (mancha

30

1 de I₂) muestra una mancha a Rf 0,67. El RMN concuerda con la estructura.

LisTreLisGliSerGliPhePheOH

5 El intermediario anterior (0,25 g, 0,0017 moles) se disuelve en Tfa (10 ml) y se desprotege haciendo borbotear a su través HBr a la temperatura ambiente durante una hora. La solución se enfría con éter seco y el producto se seca a vacío sobre P₂O₅ y KOH. El producto se purifica en una columna de Biogel P2, eluyendo con agua y posteriormente 10 en una columna de celulosa CM32, eluyendo con un gradiente de fuerza iónica lineal de acetato amónico, pH 5, que produce la separación del ácido libre y cierto éster bencílico contaminante. El aislamiento final del producto se realiza por liofilización. La CCF en butanol/ácido acético/agua 15 (5:2:2) (rociada con ninhidrina) muestra una mancha a Rf 0,20.

Análisis de aminoácidos:

Requerido : 2Lis: 1Tre: 2Gli: 1Ser: 2Phe

Encontrado: 1,77Lis: 0,96Tre: 2,00Gli: 1,06Ser: 2,10Phe.

Actividad biológica

20 Los resultados biológicos obtenidos para los Ejemplos 1-6 en tres sistemas de ensayo diferentes están presentados en las Tablas I y II. Como se deduce de la Tabla I, los péptidos son capaces de liberar histamina selectivamente de las células mastoideas de la rata in vitro y producir efectos 25 de liberación de histamina en la rata y en la piel del papión in vivo. En este último caso, en particular (tejido de primates), la actividad fué desusadamente alta.

30 La Tabla II pone de manifiesto la desensibilización cruzada en las células mastoideas de rata in vitro entre los péptidos del Ejemplo 3 y un antígeno.

TABLA I

Efectos de liberación de histamina de los péptidos sintéticos (Ejemplos 1 a 6)

Péptido	Sistema	Número de exposiciones	Actividad	Liberación de LDH/5-Cr	Inhibición de la actividad
LisTrLeIserGliPhePheO ₂ (Ejemplo n° 1)	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	7	7,5 x 10 ⁶ M	ninguna a 10 ⁻⁶ M	50 % de inhibición por Intal (10 ⁻⁴ M)
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	2	1,0 x 10 ⁻⁴ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	5,0 x 10 ⁻⁷ M		
	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	7	1,5 x 10 ⁻⁷ M		
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	2	1,0 x 10 ⁻⁴ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	1,0 x 10 ⁻⁷ M		
LisTrLeIserGliPhePheValPheO ₂ (Ejemplo n° 2)	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	10	1,0 x 10 ⁻⁶ M	ninguna a 10 ⁻⁴ M de péptido	
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	5	1,0 x 10 ⁻⁵ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	14	1,0 x 10 ⁻⁸ M		
LisTrLeIserGliPhePheValPhe (Ejemplo n° 4)	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	2	3,3 x 10 ⁻⁵ M		Inhibición parcial por una droga anti-histamínica o similar al Intal
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	4	1,0 x 10 ⁻⁴ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	1,0 x 10 ⁻⁵ M		
ProArg LisTrLeIserGliPhePheO ₂ (Ejemplo n° 5)	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	2	9,2 x 10 ⁻⁶ M		
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	4	1,0 x 10 ⁻⁴ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	1,0 x 10 ⁻⁷ M		

1

TABLA I

Efectos de liberación de histamina de los péptidos sinté

	Péptido	Sistema	Número de exposiciones	Acti
5	LisTreLisGliSerGliPhePheOMe (Ejemplo n° 1)	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	7	7,5
		Piel de rata <u>in vivo</u> ²	2	1,0
		Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	5,0
10	ArgLisTreLisGliSerGliPhePheOMe (Ejemplo n° 2)	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	7	1,5
		Piel de rata <u>in vivo</u> ²	2	1,0
		Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	1,0
15	LisTreLisGliSerGliPhePheValPheOMe (Ejemplo n° 3)	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	10	1,0
		Piel de rata <u>in vivo</u> ²	5	1,0
		Piel de papión <u>in vivo</u> ³	14	1,0
20	LisTreLisGliSerGliPhePheValPhe (Ejemplo n°4)	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	2	3,3
		Piel de rata <u>in vivo</u> ²	4	1,0
		Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	1,0
25	ProArg LisTreLisGliSerGliPhePheOMe (Ejemplo n°5)	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	2	9,2
		Piel de rata <u>in vivo</u> ²	4	1,0
		Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	1,0

30

TABLA I

os de liberación de histamina de los péptidos sintéticos (Ejemplos 1 a 6)

	Sistema	Número de exposiciones	Actividad	Liberación de LDH/ ⁵¹ Cr	Inhibición la actividad
ePheOme	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	7	7,5 x 10 ⁻⁶ M	ninguna a 10 ⁻⁶ M	50 % de ir ción por I (10 ⁻⁴ M)
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	2	1,0 x 10 ⁻⁴ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	5,0 x 10 ⁻⁷ M		
PheOme	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	7	1,5 x 10 ⁻⁷ M		
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	2	1,0 x 10 ⁻⁴ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	1,0 x 10 ⁻⁷ M		
ePheValPheOme	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	10	1,0 x 10 ⁻⁶ M	ninguna a 10 ⁻⁴ M de péptido	
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	5	1,0 x 10 ⁻⁵ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	14	1,0 x 10 ⁻⁸ M		Inhibición par por una droga a histamínica o al Intal
ePheValPhe	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	2	3,3 x 10 ⁻⁵ M		
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	4	1,0 x 10 ⁻⁴ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	1,0 x 10 ⁻⁵ M		
liPhePheOme	Células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	2	9,2 x 10 ⁻⁶ M		
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	4	1,0 x 10 ⁻⁴ M		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	2	1,0 x 10 ⁻⁷ M		

TABLA I (continuación)

Péptido	Sistema	Número de exposiciones	Actividad	Liberación de LPH/51Cr	Inhibición de la actividad
LisTrelisGliserGliphepta (Ej. 6)	células mastoideas de rata <u>in vitro</u>	4	$1,0 \times 10^{-5}M$		
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	4	$1,0 \times 10^{-4}M$		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	3	$1,0 \times 10^{-5}M$		

-
1. La concentración media de péptido para producir aproximadamente un 50 % de liberación de la histamina disponible de las células mastoideas de la rata en un cierto número de experimentos.
 2. La concentración media de péptido para dar un punto final en las valoraciones intradérmicas en la piel de la rata en un cierto número de experimentos.
 3. La concentración media de péptido para dar un punto final en las valoraciones intradérmicas en piel de papión en un cierto número de experimentos.

TABLA II

Desensibilización cruzada entre el antígeno y BRL 21547 (péptido del Ejemplo 3) en el sistema celular mastoideo

de la rata

Desensibilizador	Etapas de desensibilización				Ataque	Liberación media total de histamina, %
	1	2	3	4		
Tampón	tampón	tampón	tampón	tampón	tampón	4
	tampón	tampón	tampón	tampón	BRL 21547 ($10^{-5}M$)	47
	tampón	tampón	tampón	tampón	XOA 1 µg/ml	56
BRL 21547	$5 \times 10^{-3}M$	$10^{-7}M$	$5 \times 10^{-7}M$	$10^{-6}M$	tampón	6
	$5 \times 10^{-2}M$	$10^{-7}M$	$5 \times 10^{-7}M$	$10^{-6}M$	BRL 21547 ($10^{-5}M$)	6
	$5 \times 10^{-3}M$	$10^{-7}M$	$5 \times 10^{-7}M$	$10^{-6}M$	XOA 1 µg/ml	17
XOA	0,005 (µg/ml)	0,01	0,05	0,1	tampón	6
	0,005 (µg/ml)	0,01	0,05	0,1	BRL 21547 ($10^{-5}M$)	6
	0,005 (µg/ml)	0,01	0,05	0,1	XOA 1 µg/ml	6

1

TABLA I (continuación)

<u>Péptido</u>	<u>Sistema</u>	<u>Número de exposiciones</u>	
LisTreLisGliSerGliPhePhe (Ej. 6)	células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	4	1,
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	4	1,
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	3	1,

5

.....

10

1. La concentración media de péptido para producir aproximadamente un 50 nible de las células mastoideas de la rata en un cierto número de ex
2. La concentración media de péptido para dar un punto final en las valc rata en un cierto número de experimentos.
3. La concentración media de péptido para dar un punto final en las valc en un cierto número de experimentos.

TABLA II ..

15

Desensibilización cruzada entre el antígeno y BRL 21547 (péptido del Eje de la rata)

<u>Desensibilizador</u>	<u>Etapas de desensibilización</u>				
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	
Tampón	tampón	tampón	tampón	tampón	
	tampón	tampón	tampón	tampón	BRL
	tampón	tampón	tampón	tampón	XOA
BRL 21547	$5 \times 10^{-3} M$	$10^{-7} M$	$5 \times 10^{-7} M$	$10^{-6} M$	
	$5 \times 10^{-3} M$	$10^{-7} M$	$5 \times 10^{-7} M$	$10^{-6} M$	BRL
	$5 \times 10^{-3} M$	$10^{-7} M$	$5 \times 10^{-7} M$	$10^{-6} M$	XOA
XOA	0,005 ($\mu g/ml$)	0,01	0,05	0,1	
	0,005 ($\mu g/ml$)	0,01	0,05	0,1	BR
	0,005 ($\mu g/ml$)	0,01	0,05	0,1	XO

20

25

30

TABLA I (continuación)

	<u>Sistema</u>	<u>Número de exposiciones</u>	<u>Actividad</u>	<u>Liberación de LDH/⁵¹Cr</u>	<u>Inhibición de la actividad</u>
a(Ej. 6)	células mastoideas de rata <u>in vitro</u> ¹	4	$1,0 \times 10^{-5} M$		
	Piel de rata <u>in vivo</u> ²	4	$1,0 \times 10^{-4} M$		
	Piel de papión <u>in vivo</u> ³	3	$1,0 \times 10^{-5} M$		

.....

la de péptido para producir aproximadamente un 50 % de liberación de la histamina dispo- mastoideas de la rata en un cierto número de experimentos.

la de péptido para dar un punto final en las valoraciones intradérmicas en la piel de la aereo de experimentos.

la de péptido para dar un punto final en las valoraciones intradérmicas en piel de papión le experimentos.

TABLA II

la entre el antígeno y BRL 21547 (péptido del Ejemplo 3) en el sistema celular mastoideo de la rata.

<u>Etapas de desensibilización</u>				<u>Ataque</u>	<u>Liberación media total de histamina, %</u>
<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>		
tampón	tampón	tampón	tampón	tampón	4
tampón	tampón	tampón	tampón	BRL 21547 ($10^{-5} M$)	47
tampón	tampón	tampón	tampón	XOA 1 µg/ml	56
$5 \times 10^{-3} M$	$10^{-7} M$	$5 \times 10^{-7} M$	$10^{-6} M$	tampón	6
$5 \times 10^{-3} M$	$10^{-7} M$	$5 \times 10^{-7} M$	$10^{-6} M$	BRL 21547 ($10^{-5} M$)	6
$5 \times 10^{-3} M$	$10^{-7} M$	$5 \times 10^{-7} M$	$10^{-6} M$	XOA 1 µg/ml	17
0,005 (µg/ml)	0,01	0,05	0,1	tampón	6
0,005 (µg/ml)	0,01	0,05	0,1	BRL 21547 ($10^{-5} M$)	6
0,005 (µg/ml)	0,01	0,05	0,1	XOA 1 µg/ml	6

MÉTODOS

(a) Liberación de (1) histamina, (2) Cr⁵¹ y (3) deshidrogenasa láctica de las células mastoideas peritoneales de la rata (ensayo in vitro en células mastoideas de rata)

Unas células mastoideas, derivadas de los lavados peritoneales de tres ratas macho Wistar exógamias (250-300 g), se purificaron por el procedimiento de Cooper y Stanworth (Preparative Biochem. 4(2), 105, 1975).

Las células purificadas se lavaron dos veces en tampón incompleto de Dulbecco (es decir, exento de sales minerales) y después se suspendieron de nuevo en medio de Dulbecco hasta el volumen requerido. En un experimento típico, se utilizaron células suficientes para 30 ataques duplicados, es decir 60 muestras y en este caso el volumen de resuspensión empleado fué de 6,1 ml. Se tomaron 0,1 ml de suspensión celular para estimar el número de células.

(1) Liberación de histamina

Se empleó un tercio de la suspensión celular. A partes alícuotas duplicadas de 0,9 ml de solución de ataque, preparada en medio de Dulbecco completo y precalentada a 37°C, se añadieron 0,1 ml de suspensión celular. Después las soluciones se sacudieron suavemente y se dejaron incubar durante 5 minutos a 37°C. A continuación los tubos de reacción se sacaron rápidamente de la incubadora y se introdujeron en un baño de hielo. Después se separaron los líquidos sobrenadantes de la población celular mediante centrifugación durante 3 minutos a 1000 rpm. A continuación los residuos celulares se trataron con 2 ml de ácido perclórico 0,4N y se dejaron en reposo durante 30 minutos aproximadamente, a la temperatura ambiente. La proteína precipitada se separó por centri-

1 fugación y las soluciones sobrenadantes se dejaron aparte
para el análisis de la histamina. Las soluciones sobrenadan-
tes originales se trataron con 1,0 ml de perclorato 0,8N y
después se trataron de forma similar a los residuos celula-
5 res. La histamina se midió por el método de Evans, Lewis y
Thompson (Life Sciences, 12, 327, 1973) empleando un auto-
analizador Technicon. La liberación de histamina se calculó
como porcentaje de la histamina total existente en cada so-
lución de ataque.

10 (2) Liberación de Cr⁵¹

Se empleó un tercio de la suspensión celular. A 2,0 ml
aproximadamente de suspensión celular en medio de Dulbecco
se agregaron 0,1 ml de una solución de cromato sódico marca-
do con Cr⁵¹. Se emplearon aproximadamente 50-100 μ Ci de
15 Cr⁵¹ (actividad específica: 300-500 μ Ci/mg Cr). Las célu-
las se dejaron en reposo durante 30 minutos a la temperatu-
ra ambiente y después el exceso de cromo se separó lavando
las células tres veces en tampón de Dulbecco. El gránulo de
células se resuspendió finalmente en el mismo tampón y des-
20 pués se añadieron 0,1 ml de suspensión celular a 0,9 ml de
cada solución de ataque, previamente calentada a 37°C. Al
cabo de 5 minutos de incubación, las suspensiones celulares
se retiraron del baño de agua y los líquidos sobrenadantes
se separaron por centrifugación. Se midió la actividad pre-
25 sente en los líquidos sobrenadantes recuperados completos,
utilizando un contador gamma Tracer Laboratory Spectroma-
tic. El porcentaje de Cr⁵¹ liberado se determina en rela-
ción con los valores obtenidos para las soluciones de con-
30 trol positivo y negativo.

1 (3) Medida de LDH

Se empleó un tercio de la suspensión celular. El procedimiento de incubación fué idéntico al descrito anteriormente y se realizó simultáneamente hasta que se separaron
5 los líquidos sobrenadantes de la solución de ataque de los residuos celulares. Después se estimó la actividad de deshidrogenasa láctica directamente en las soluciones sobrenadantes por el método de Johnson y Erdős (Proc.Soc.Exp.Biol.Med.
142, 1252, 1973). A 0,5 ml de líquido sobrenadante se agregaron 0,5 ml de NAD (1 mM en tampón Tris 0,2M, pH 8,5). Después se tomaron 0,5 ml de esta solución y se trataron con
10 50 µl de ácido láctico (50 mM en tampón Tris 0,2M, pH 8,5); como control se añadieron 50 µl de tampón Tris 0,2M (pH 8,5) a una segunda parte alícuota (0,5 ml) de la solución de NAD.
15 Las soluciones se incubaron a la temperatura ambiente durante 20 minutos y después se midió la emisión de fluorescencia. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 340 y 460 nm respectivamente. Todas las medidas se realizaron empleando un espectrofluorímetro automático Baird
20 Atomic (Fluoripoint). La actividad LDH se determinó en forma del aumento de fluorescencia sobre el control, debido a la formación de NADH después de la adición de lactato. El porcentaje de LDH liberada fué determinada en relación con la intensidad de la fluorescencia obtenida en los líquidos sobrenadantes de la solución de ataque de control positivo
25 (es decir, Triton X 100 ataque).

(b) Método de ensayo en la piel

Los ensayos en la piel se realizaron en los lomos afeitados de los animales (ratas y papiones) inmediatamente
30 después de la inyección intravenosa de azul cielo pontamine

1 (5 %) en solución acuosa de cloruro sódico (0,9 %), a una
dosis de 0,1 ml por kg de peso corporal en el caso de las ra-
tas y 5 ml por animal en el caso de los papiones.

5 El péptido en solución acuosa de cloruro sódico (0,9 %) o el control salino se inyectaron intradérmicamente a volúmenes de 0,05 ml o 0,10 ml. Las reacciones de la piel se leyeron 20 minutos después del ataque intradérmico.

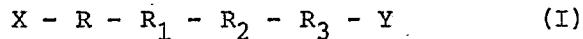
(c) Desensibilización cruzada en el sistema de células mastoideas de la rata in vitro entre el antígeno y el péptido

10 Unas ratas Brown Norway fueron inmunizadas intraperitonealmente con 100 µg de ovoalbúmina (XOA) en 1 mg de "alumbre". El día 27, las células mastoideas peritoneales se extirparon, se reunieron y lavaron. Unas partes alícuotas de células se desensibilizaron mediante adición de cuatro
15 incubaciones de 5 minutos con diversas concentraciones de XOA o péptido o con tampón solo. Después las células se sometieron a un ataque de péptido o XOA de liberación de histamina óptima o se atacaron con tampón solo.

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

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de un péptido de fórmula (I):



25 y sales del mismo, constituido por 6 a 12 restos de aminoácidos naturales, donde R es un grupo opcionalmente presente, capaz de comunicar a un péptido resistencia a la descomposición enzimática; R₁ representa un resto de un aminoácido básico, opcionalmente ligado a uno o más restos de aminoácidos
30 no hidrófobos neutros y/o aminoácidos básicos; R₂ representa

1 un resto de un aminoácido no hidrófobo neutro, opcionalmen-
te ligado a uno de más restos de otros aminoácidos no hidró-
fobos neutros; R_2 representa un resto de un aminoácido hidró-
fobo, opcionalmente ligado a uno o más restos de aminoáci-
5 dos no hidrófobos neutros y/o aminoácidos hidrófobos; X es
hidrógeno o un grupo N=protector es Y hidroxilo o un grupo -
protector del C terminal; cuyo procedimiento consiste en so-
meter a reacción de copulación los aminoácidos constituyen-
tes en el orden correcto para formar el péptido deseado, es-
10 tando protegidos cualquier grupo amino o grupo carboxilo que
no participe en las reacciones de copulación, y después, si
se desea, separar estos grupos protectores y, si se desea,
formar la sal deseada del péptido.

15 2. Un procedimiento según la reivindicación 1,
donde los restos de aminoácidos básicos que han de ser copu-
lados están seleccionados entre arginilo, lisilo y ornitilo;
los restos de aminoácidos no hidrófobos neutros que han de
ser copulados están seleccionados entre glicilo, alanilo, -
serilo y treonilo; y los restos de aminoácidos hidrófobos -
20 que han de ser copulados están seleccionados entre fenilala-
nina, valina y leucina.

25 3. Un procedimiento según las reivindicaciones 1
o 2, donde R está presente en el péptido deseado y está se-
leccionado entre prolilo, hidroxiprolilo, un resto de un -
D-aminoácido y un resto de un aminoácido con la omisión del
grupo amino terminal.

30 4. Un procedimiento según cualquiera de las pre-
cedentes reivindicaciones, donde todos los grupos protecto-
res se separan de los grupos amino del péptido y el grupo
ácido carboxílico terminal es o bien protegido en forma de

1 amida o de éster metílico o es desprotegido para formar un
grupo ácido carboxílico libre.

5 5. Un procedimiento según cualquiera de las preceden-
tes reivindicaciones, donde se copulan de 8 a 10 restos de
aminoácidos para formar un octa-, nona- o deca-péptido.

10 6. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde
 R_1 es [b-c-d-e], R_2 es [f-g-h] y R_3 es [i-j-k-l], donde
c y e son lisilo, arginilo u ornitilo; d es treonilo o seri-
lo; b es un arginilo, lisilo u ornitilo opcionalmente pre-
sentes; f y h son glicilo o alanilo; g es serilo o treonilo;
i y j son fenilalanilo, valilo o leucilo; y k y l son fenila-
lanilo, valilo o leucilo opcionalmente presentes; o sales -
del mismo.

15 7. Un procedimiento según la reivindicación 1, donde
el péptido obtenido está seleccionado entre el grupo formado
por:

Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe - Y^1

Arg Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe - Y^1

Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe Val Phe - Y^1

20 Arg Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe Val Phe - Y^1

Pro Arg Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe - Y^1

Pro Arg Lis Tre Lis Gli Ser Gli Phe Phe Val Phe - Y^1

donde Y^1 es hidroxilo, $-NH_2$ o metoxi.

25 8. Se reivindica por último como objeto sobre el que
ha de recaer la patente de invención que se solicita: UN
PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN PEPTIDO.

