

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

ES

11

NUMERO	473.090
FECHA DE PRESENTACION	5-9-78

AI

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

PATENTE DE INVENCION

40 PRIORIDADES: 51 NUMERO 37193/77 (prov.)	52 FECHA 6-9-77	53 PAIS G. Bretaña
---	--------------------	-----------------------

47 FECHA DE PUBLICIDAD	54 CLASIFICACION INTERNACIONAL C07D/A61K	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	---	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE L-(PIRO)GLUTAMIL-L-HISTIDIL-GLICINA"

71 SOLICITANTE (S)

NYEGAARD & CO, A/S 25.x.127-260

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Nycoveien 2, Postboks 4220, Oslo 4, Noruega

72 INVENTOR (ES)

Karl-Ludwig Reichelt y Olav Edvardt Trygstadt

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

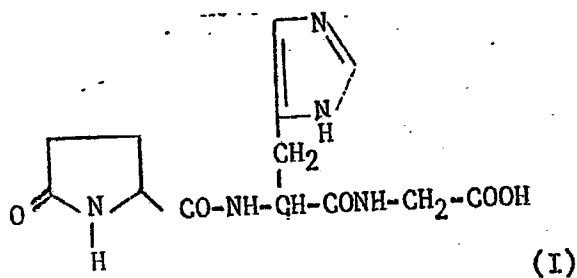
D. ALBERTO DE ELZABURU MARQUEZ (P.- 69.818)

1 La presente invención se refiere a un nuevo péptido y a las sales del mismo así como a procedimientos para su preparación. El péptido posee interesantes propiedades anorexígenas.

5 La presente invención se basa en el descubrimiento de un nuevo péptido encontrado en la orina de pacientes que padecen anorexia grave, cuyo péptido posee interesantes propiedades anorexígenas y es, por tanto, de interés potencial para usar contra la obesidad ocasionada por sobre-
10 alimentación.

Por consiguiente, según una característica de la presente invención, se proporcionan L-(piro)glutamil-L-histidil-glicina y sus sales.

15 La fórmula química del nuevo tripéptido de la presente invención es la siguiente:



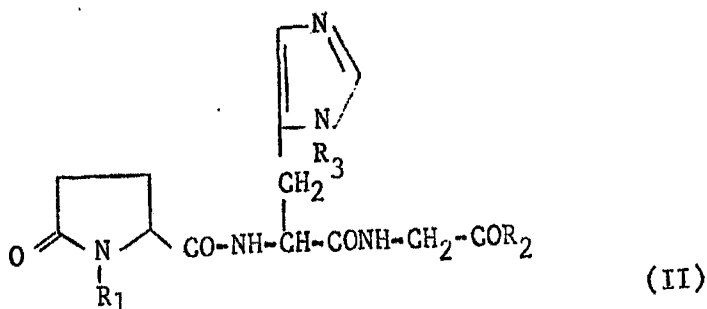
20 siendo de la serie L los restos de piroglutamilo o histidilo.

25 Las sales útiles para incorporar en composiciones farmacéuticas son las sales fisiológicamente compatibles. Sin embargo pueden ser útiles otras sales en la preparación del nuevo tripéptido y las sales del mismo fisiológicamente compatibles.

30 Según otra característica de la presente inven-
13098

1 ción se proporciona un procedimiento de preparación de
L-(piro)glutamil-L-histidil-glicina que comprende dejar
sin protección un compuesto de fórmula:

5



10

(en la que los restos de piroglutamilo e histidilo son cada una de la serie L, cada uno de R_1 y R_3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de grupos amino y R_2 representa un grupo hidroxilo o un grupo protector de grupos carboxilo, con la condición de que por lo menos uno de R_1 , R_2 y R_3 represente un grupo protector), con lo que se obtiene L-(piro)glutamil-L-histidil-glicina o una de sus sales.

20

Según se ha indicado, el compuesto de fórmula II puede estar sólo parcialmente protegido, estando sólo uno o dos de R_1 , R_2 y R_3 en la forma protegida; tales compuestos pueden ser preparados mediante desprotección parcial selectiva de un compuesto de fórmula II en el que la totalidad de R_1 , R_2 y R_3 están en la forma protegida, o pueden ser sintetizados en forma parcialmente protegida. En particular R_3 será comúnmente hidrógeno.

25

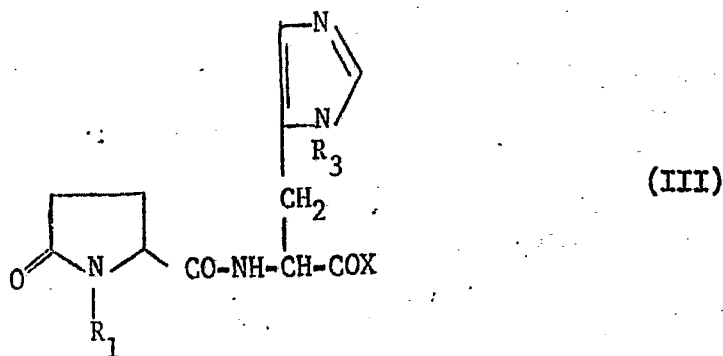
30

No obstante, si se usa un compuesto de fórmula II en el que R_1 , R_2 y R_3 representan cada uno un grupo protector es ventajoso retirar simultáneamente todos los

1 grupos protectores.

Puede prepararse un compuesto de fórmula I o un compuesto de fórmula II, por ejemplo, haciendo reaccionar un compuesto de fórmula:

5



10

(en donde los restos de piroglutamilo e histidilo son cada una de la serie L, cada uno de R_1 y R_3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de grupos amino y X representa un grupo hidroxilo o un grupo de activación de ácidos carboxílicos) con un compuesto de fórmula:

15



(en donde R_2 representa un grupo hidroxilo o un grupo protector de grupos carboxilo) con lo que se obtiene un compuesto de fórmula I ó de fórmula II.

20

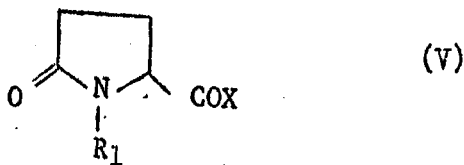
Se usa preferiblemente un compuesto de fórmula III en el que R_1 representa un grupo protector de grupos amino y/o X representa un grupo de activación de ácidos carboxílicos. R_3 es preferiblemente hidrógeno. Se usa preferiblemente un compuesto de fórmula IV en el que R_2 representa un grupo protector de grupos carboxilo.

25

De modo semejante, puede prepararse por ejemplo un compuesto de fórmula I o un compuesto de fórmula II, haciendo reaccionar el isómero L de un compuesto de fór-

30

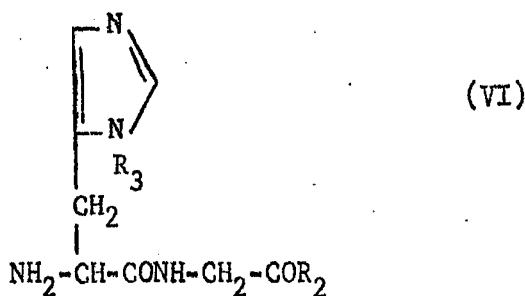
1 m. 1 - mula:



5

(en la que R_1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de grupos amino y X representa un grupo hidroxilo o un grupo activador de ácidos carboxílicos) con el isómero L de un compuesto de fórmula:

10



15

(en la que R_2 representa un grupo hidroxilo o un grupo protector de grupos carboxilo y R_3 representa hidrógeno o un grupo protector de grupos amino) con lo que se obtiene un compuesto de fórmula I ó II.

20

Se usa preferiblemente un compuesto de fórmula V en el que R_1 representa un grupo protector de grupos amino y/o X representa un grupo activador de ácidos carboxílicos. R_3 es preferiblemente hidrógeno. Un compuesto de fórmula VI se usa preferiblemente en el que R_2 representa un grupo protector de grupos carboxilo.

25

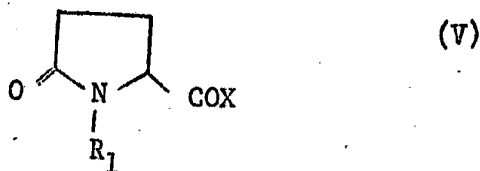
Puede prepararse un compuesto de fórmula III según se ha definido anteriormente en la Memoria (en donde X representa un grupo activador de ácidos carboxílicos), por ejemplo, haciendo reaccionar el isómero L de un

30

1 compuesto de fórmula III (en donde X representa un grupo hidroxilo), por métodos conocidos per se para formar un compuesto de fórmula III en donde X representa un grupo activador de ácidos carboxílicos.

5 Puede prepararse, por ejemplo, un compuesto de fórmula III según se ha definido anteriormente aquí (en donde X representa un grupo hidroxilo) haciendo reaccionar el isómero I de un compuesto de fórmula:

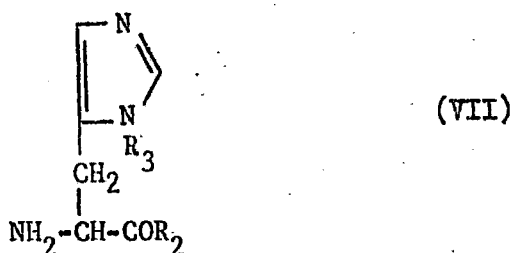
10



15

(en donde R_1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de grupos amino, y X representa un grupo hidroxilo o un grupo activador de ácidos carboxílicos) con el isómero I de un compuesto de fórmula:

20



25

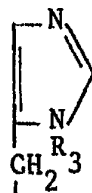
(en donde R_2 y R_3 tienen los significados anteriores) y donde se usa un compuesto de fórmula VII, en el que R_2 representa un grupo protector de grupos carboxilo, convirtiendo el compuesto así obtenido en un compuesto de fórmula III (en donde X representa un grupo hidroxilo) por separación del grupo protector de grupos carboxilo.

30

1 Se prefiere usar un compuesto de fórmula V en
 la que R_1 representa un grupo protector de grupos amino
 y/o en el que X representa un grupo activador de ácidos
 5 carboxílicos. Se prefiere también usar un compuesto de
 fórmula VII en el que R_2 representa un grupo protector
 de ácidos carboxílicos, cuyo grupo se separa después de
 la reacción, para formar un compuesto de fórmula III en
 la que X representa un grupo hidroxilo.

10 Puede prepararse, por ejemplo, un compuesto de
 fórmula VI como se ha definido anteriormente en esta Me-
 moria, separando el grupo o grupos protectores de grupos
 amino de un compuesto de fórmula:

15



(VIa)



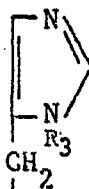
20

(en donde R_1 representa un grupo protector de grupos ami-
 no y R_3 representa hidrógeno o un grupo protector del gru-
 po amino) con lo que se obtiene un compuesto de fórmula
 VI.

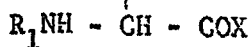
25

El compuesto de fórmula VI ó VIa puede ser pre-
 parado, por ejemplo, haciendo reaccionar el isómero L de
 un compuesto de fórmula:

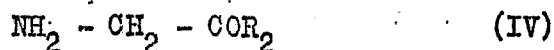
30



(VIII)



1 (en donde R_1 y R_3 tienen los significados anteriores y X representa un grupo hidroxilo o un grupo activador de ácidos carboxílicos) con un compuesto de fórmula:



5 (en donde R_2 representa un grupo hidroxilo o un grupo protector de grupos carboxilo) con lo que se obtiene un compuesto de fórmula VI o VIa.

Se prefiere usar un compuesto de fórmula VIII en el que R_1 representa un grupo protector de grupos amino, cuyo grupo se separa después de la reacción. Se prefiere también usar un compuesto de fórmula VIII en la que X representa un grupo activador de ácidos carboxílicos. Se usa preferiblemente un compuesto de fórmula IV en la que R_2 representa un grupo protector de grupos carboxilo. R_3 es preferiblemente hidrógeno.

15 Si en cualquiera de las reacciones anteriores se obtiene una mezcla de productos, el producto deseado puede ser aislado de la mezcla de reacción mediante métodos convencionales conocidos per se.

20 Se podrá apreciar que los compuestos de la presente invención pueden ser preparados, si se desea, según los procedimientos aquí descritos usando el método de síntesis de péptidos en fase sólida. En tal método el grupo protector del grupo carboxilo del aminoácido en el C terminal puede estar en forma de una resina.

25 Los compuestos de fórmula IV, V, VII y VIII o bien son materiales de partida de que se dispone con facilidad o pueden derivarse fácilmente de materiales de partida disponibles según métodos bien conocidos en la bibliografía.

1 Se conoce una extensa selección de grupos protectores y activadores así como procedimientos de protección, activación y copulación de aminoácidos y figuran como ejemplos en las publicaciones siguientes:

5 The Peptides, Volúmenes 1 ó 2, Schroder, E., y Lubke, K., Academic Press, Nueva York y Londres, 1965 y 1966; Synthetic Peptides, Vols. 1-4, Pettit, G.R., Van Nostrand, Reinhold, Nueva York 1970, 1971, 1975 y 1976; Methoden der Organischen Chemie, Synthese von Peptiden, Band 15, Houben-Weyl, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974; 10 y Amino Acids Peptides and Proteins, Vol. 4-8, The Chemical Society, Londres 1972, 1974, 1975 y 1976.

Así, por ejemplo grupos protectores de grupos amino que pueden ser empleados incluyen el carbobenzoxi (denominado también más adelante en esta memoria Cbz ó Z), 15 t-butoxicarbonilo (denominado también más adelante en esta memoria BOC) y grupos acilo tales como, por ejemplo, un grupo acetilo o un grupo formilo.

20 Grupos protectores de grupos carboxilo que pueden ser empleados, por ejemplo, incluyen grupos éster fácilmente desdoblables tales como grupos bencilo (denominado también más adelante Bzl), p-nitrobencilo ó t-butilo.

25 Grupos activadores de ácidos carboxílicos que pueden ser empleados, por ejemplo, incluyen anhídridos mixtos, azidas o ésteres activados tales como, por ejemplo, el éster p-nitrofenílico, un éster 2,4,5-tricloro- fenílico o un éster N-hidroxisuccinimidilo.

30 Puede apreciarse que existe un amplio rango de otros grupos tales como, se detalla, por ejemplo, en las

1 referencias bibliográficas antes mencionadas y el uso de la totalidad de tales grupos en los procedimientos antes descritos en esta Memoria caen dentro de la extensión de la presente invención.

5 Los procesos de la presente invención pueden ser llevados a cabo generalmente mediante el uso de materiales de partida de L-piroglutamilo y L-histidilo en ausencia de los isómeros D de los mismos. Así, es deseable efectuar las reacciones bajo condiciones que eviten la
10 racemización con objeto de evitar la necesidad de un proceso de resolución al término de la secuencia total de reacciones.

También es posible, pero menos conveniente, usar materiales de partida de piroglutamilo e histidilo racémicos, e incluir una o más etapas de resolución óptica.
15

Los grupos de protección de grupos carboxilo pueden ser introducidos mediante métodos convencionales, p.e., por reacción con un reactivo de esterificación adecuado, por ejemplo un alcohol tal como alcohol bencílico o p-nitrobencílico en presencia de ácido, por ejemplo, ácido p-toluensulfónico.
20

Los grupos protectores de grupos amino pueden ser introducidos mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante reacción con haluros de ácido adecuados, tales como cloruro de carbobenzoxilo, o cloruro de pivaloilo, o anhídridos de ácido tales como anhídrido acético.
25

En general es conveniente efectuar las reacciones de copulación a temperaturas bajas, por ejemplo entre -20°C hasta la temperatura ambiente, convenientemente en un sistema disolvente adecuado, por ejemplo, tetrahidro-
30

1 furano, dioxano, dimetilformamida, cloruro de metileno o una mezcla de estos disolventes.

5 La copulación de grupos amino y carboxilo libres puede ser efectuada, por ejemplo, usando diciclohexilcarbodiimida (DCC). Otro agente de copulación que puede ser empleado, por ejemplo, es N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleína.

10 La activación de grupos carboxilo puede efectuarse por ejemplo por conversión del ácido en un derivado reactivo, por ejemplo, el anhídrido de ácido que puede ser preparado mediante el uso de cloroformiato de etilo e isobutilo. La acilación de otro aminoácido con un anhídrido mixto u otro derivado carboxílico activado puede ser efectuada por métodos convencionales en la síntesis de péptidos.

15 Habitualmente, el producto de reacción después de la etapa de copulación contiene uno o más grupos protectores. Si se desea, éstos pueden ser separados, por ejemplo de un modo selectivo. Así pues, es posible separar sólo ciertos grupos, manteniendo otros intactos durante la reacción o reacciones subsiguientes.

20 Como se ha indicado antes existe un amplio rango de procedimientos para separar grupos protectores de grupos amino y grupos protectores de grupos carboxilo. Así, por ejemplo, puede separarse un grupo protector de grupos amino por acidólisis, hidrogenólisis, tratamiento con hidróxido amónico diluido, tratamiento con sodio, tratamiento con amida de sodio, tratamiento con hidracina, o hidrólisis enzimática por ejemplo con leucinaaminopeptidasa.

25 Métodos que son de interés incluyen tratamiento con bromu-

30

13098

1 ro de hidrógeno anhidro por ejemplo en ácido acético glacial, tratamiento con ácido trifluoroacético e hidrogenación catalítica.

5 Así los grupos carbobenzoxi y t-butoxicarbonilo pueden ser separados, por ejemplo, usando bromuro de hidrógeno anhidro, convenientemente en presencia de ácido acético glacial o usando ácido trifluoroacético convenientemente en presencia de ácido clorhídrico concentrado; los grupos acilo pueden ser separados, por ejemplo, mediante 10 hidrólisis convencional con ácido o mediante hidrólisis enzimática según se ha descrito antes.

15 La separación de grupos protectores de grupos carboxilo puede ser efectuada, por ejemplo, mediante saponificación, acidólisis, hidrogenólisis o hidrólisis enzimática. Así, por ejemplo, puede efectuarse saponificación con un hidróxido de metal alcalino, convenientemente en presencia de agua, un alcohol y/o acetona. La acidólisis puede ser efectuada, por ejemplo, mediante el uso de bromuro de hidrógeno anhidro o ácido trifluoroacético y la 20 hidrogenólisis puede ser efectuada, por ejemplo, mediante hidrogenación catalítica, por ejemplo, mediante el uso de paladio sobre carbono, convenientemente paladio sobre carbón vegetal al 10%. La hidrólisis enzimática puede efectuarse, por ejemplo, mediante el uso de leucinaaminopeptidasa. Así, por ejemplo, los grupos bencilo y p-nitrobencilo pueden ser separados mediante hidrogenólisis y los grupos t-butilo pueden ser separados, por ejemplo, mediante 25 acidólisis o saponificación.

30 Los grupos protectores de grupos amino y los grupos protectores de grupos carboxilo pueden ser separa-

1 dos simultáneamente, por ejemplo, mediante acidólisis, hidrólisis alcalina, hidrogenólisis, tratamiento con sodio o amida de sodio, o mediante hidrólisis enzimática. Tales métodos incluyen tratamiento con bromuro de hidrógeno, convenientemente en presencia de ácido acético glacial y tratamiento con un alcohol que contenga disuelto, convenientemente, cloruro de hidrógeno seco.

5
10 Un método de retirar la protección es, por ejemplo, hidrogenación catalítica, convenientemente usando como catalizador paladio sobre carbón, por ejemplo, y convenientemente en la presencia de un disolvente tal como, por ejemplo, agua, metanol, dioxano, ácido acético o t-butanol. Este método separa, por ejemplo, el grupo carbobenzoilo, pero deja intactos el t-butoxicarbonilo o los grupos acilo.

15
20 El producto de reacción puede aislarse entonces y purificarse mediante métodos conocidos, tales como por ejemplo extracción, cristalización o cromatografía (por ejemplo de capa delgada o en columna). Puede ser ventajoso aislar y purificar el péptido deseado obtenido como producto mediante formación de sal (p.e. formación de clorhidrato, bromhidrato, o sal de dicitclohexilamina). Los productos intermedios y finales pueden ser caracterizados, por ejemplo, mediante parámetros cromatográficos (control de pureza), rotación óptica y, posiblemente, datos espectroscópicos.

25
30 Según todavía otra característica de la presente invención se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden como ingrediente activo por lo menos un compuesto de fórmula I según se ha definido anteriormente

1 en esta Memoria, o una sal del mismo fisiológicamente com-
patible, en asociación con un vehículo o excipiente farma-
céutico. Las composiciones según la invención pueden pre-
sentarse, por ejemplo, en una forma adecuada para su ad-
5 ministración oral, parenteral o rectal.

La expresión "farmacéutico" tal como aquí se
usa, incluye aplicaciones veterinarias de la invención.

10 Los compuestos según la invención pueden presen-
tarse en las formas farmacológicas de administración con-
vencionales, tales como tabletas, tabletas recubiertas,
soluciones, emulsiones, polvos, cápsulas o formas de li-
beración retardada. Para la preparación de estas formas
pueden emplearse excipientes farmacéuticos convencionales
así como los métodos habituales de producción. Pueden pro-
15 ducirse tabletas, por ejemplo, mezclando el ingrediente
o ingredientes activos con excipientes conocidos, tales
como, por ejemplo, con diluyentes tales como carbonato
de calcio, fosfato de calcio o lactosa, desintegrantes
tales como almidón de maíz o ácido algínico, aglutinantes
20 tales como almidón o gelatina, lubricantes tales como es-
tearato de magnesio o talco, y/o agentes para obtener una
liberación retardada, tales como carboxipolimetileno, car-
boximetilcelulosa, acetoftalato de celulosa, o poliacetato
de vinilo.

25 Las tabletas pueden estar constituidas, si se
desea, por varias capas. Pueden producirse tabletas recu-
biertas mediante recubrimiento de núcleos, obtenidos de
un modo semejante a las tabletas, con agentes comúnmente
usados para recubrimiento de tabletas, por ejemplo, poli-
30 vinilpirrolidona o goma laca, goma arábiga, talco, dióxi-

1 do de titanio o azúcar. Con objeto de obtener una liberación retardada o evitar incompatibilidades, el núcleo puede estar constituido también por varias capas. El recubrimiento de la tableta puede estar constituido también por
5 varias capas al objeto de obtener una liberación retardada, en cuyo caso pueden usarse los excipientes para tabletas antes citados.

Los jarabes del ingrediente activo según la invención o combinaciones de ingredientes activos, pueden
10 contener adicionalmente un edulcorante, tal como sacarina, ciclamato, glicerina o azúcar, y/o agentes para mejorar el sabor tales como aromatizantes, por ejemplo vainillina o extracto de naranja. También pueden contener agentes de suspensión o espesantes, tales como carboximetilcelulosa
15 sódica, agentes humectantes, tales como por ejemplo productos de condensación de alcoholes grasos con óxido de etileno, o agentes de conservación tales como p-hidroxibenzoatos.

Pueden prepararse soluciones inyectables, por
20 ejemplo, del modo convencional, tal como mediante la adición de agentes de conservación tales como p-hidroxibenzoatos, o estabilizadores tales como Complexonas. Las soluciones se llenan después en viales o ampollas de inyección.

25 Cápsulas que contienen uno o varios ingredientes activos pueden ser producidas, por ejemplo, mezclando los ingredientes activos con excipientes inertes, tales como lactosa o sorbita, y llenando la mezcla en cápsulas de gelatina.

30 Supositorios adecuados pueden ser producidos,

1 por ejemplo, mezclando el ingrediente activo o combinaciones de ingredientes activos, con los excipientes convencionales destinados a este fin, tales como grasas naturales o polietilenglicol o sus derivados.

5 Ventajosamente, las composiciones pueden ser formuladas como unidades de administración, estando adaptada cada unidad a suministrar una dosis fija de ingrediente activo. Tabletas, tabletas recubiertas, cápsulas, supositorios y ampollas son ejemplos de formas unitarias de administración adecuadas. Cada unidad de administración
10 contiene preferiblemente de 5 a 100 n.moles de dicho ingrediente activo y en especial de 15 a 50 n.moles de dicho ingrediente activo.

15 Según se ha indicado antes, los nuevos compuestos pueden ser administrados al hombre o a otros animales. La dosis óptima es, en general, proporcional al área superficial y está comprendida entre 5 y 50 n.moles/m² de área superficial/día. Así, para el hombre que tiene un área superficial del orden de 1,5 a 2,0 m², la dosis diaria óptima está comprendida entre 7,5 y 100 n.moles/día.
20 Es apropiado un tratamiento de 1 a 5 semanas, por ejemplo, de 3 semanas. En general, la administración es preferiblemente por inyección.

25 Según todavía otra característica de la presente invención, se proporciona un método de tratamiento de la obesidad causada por sobrealimentación, que comprende administrar una cantidad efectiva de una composición farmacéutica según aquí se ha mencionado anteriormente, a un paciente que padece tal obesidad. Los péptidos pueden ser
30 usados también para producir modelos de animales que pue-

1 den ser estudiados y usados para experimentos terapéuti-
cos.

5 Otro uso principal del nuevo péptido, sin embar-
go, es en la producción de material para técnicas de en-
sayo inmunológico. El péptido puede después ser unido por
covalencia a un excipiente adecuado de alta magnitud mole-
cular, tal como albúmina, polilisina o poliprolina, con
objeto de ser inyectado en el animal que produce anticuer-
pos (por ejemplo conejos, cobayas ó cabras). Se obtienen
10 antisueros de alta especificidad mediante el uso de téc-
nicas de absorción bien conocidas usando el excipiente de
alta magnitud molecular. Introduciendo radiactividad
(^{14}C , ^{18}O , ^{15}N , etc) en la molécula del péptido, puede
idearse rápidamente un radioinmunoensayo y usarse para de-
15 terminar el péptido en los diferentes fluidos biológicos
tales como suero (plasma), orina y fluido cerebroespinal.

20 En el ejemplo la retirada de protección median-
te hidrogenación catalítica se efectúa usando paladio so-
bre carbón al 10% como catalizador. El método del Ejemplo
ha sido escogido para evitar protección de la cadena la-
teral, simplificando así el procedimiento experimental to-
tal.

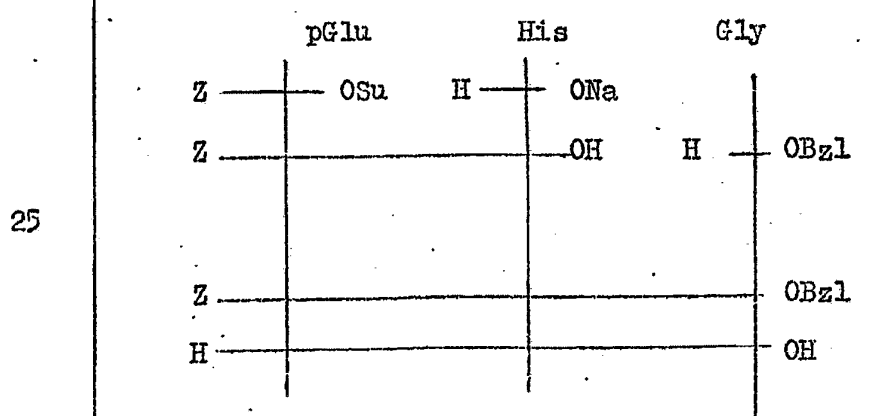
En el Ejemplo se usan las abreviaturas siguien-
tes:

25 DCC - dicitclohexilcarbodiimida
DCU - dicitclohexilurea
DME - dimetoxietano
DMF - dimetilformamida
Gly - glicil-
30 His - L-histidil-

- 1 pGlu - L-(piro)glutamil-
- HOSu - N-hidroxisuccinimida
- OBzl - éster bencílico
- TEA - trietilamina
- 5 THF - tetrahidrofurano
- p-TosOH - ácido p-toluensulfónico
- Z - carbobenzoxi-
- i-PrOH - isopropanol
- Gel - Gel de sílice G
- 10 S1 - CH₂Cl₂/MeOH (20:3)
- S2 - MeOH/benceno (1:1)
- S4 - EtOH/H₂O (7:3)
- UV - Luz ultravioleta - 254 nm
- N - Ninhidrina
- 15 CT - cloro/o-tolidina
- P - Acido sulfanílico diazotado (Reactivo de Pauly)

Los disolventes empleados eran de calidad "para análisis" (p.a) y fueron tratados según procedimientos habituales de laboratorio antes de ser usados.

ESQUEMA DE SINTESIS



a) ESTER DE N-HIDROXI-SUCCINIMIDA DEL ACIDO CARBOBENZOXI-
-L-(PIRO)GLUTAMICO (Z-pGlu(OSu))

1 Se sintetizó Z-pGlu(OSu) de un modo similar al
descrito por P. Kurath, A.M. Thomas, Helv. Chim. Acta,
56 1656-61 (1973), es decir, del siguiente modo: Se disol-
vieron Z-pGlu(OH) (15 g, 57 mmoles) y HOSu (7,25 g, 63
5 mmoles) en DME (50 ml) y la solución se enfrió a -20°C
(en CCl_4/CO_2). Se añadió a la solución DCC (13 g, 63 mmo-
les) en DME (25 ml), gota a gota, bajo vigorosa agitación.
Después de 2 horas a -20°C, la temperatura se elevó lenta-
mente a temperatura ambiente y se continuó agitando duran-
te la noche. El DCU precipitado se separó por filtración
10 y el disolvente se evaporó en vacío. El residuo se recrís-
talizó en i-PrOH, obteniéndose 14 g (70%, bib. 76%) del
producto con punto de fusión 130°C (bib. 130-131°C). R_f
(S1) 0,70 - 0,76.

15 b) CARBOBENZOYL-L-(PIRO)GLUTAMIL-HISTIDINA (Z-pGlu-His(OH))

Se sintetizó Z-pGlu-His(OH) del siguiente modo:
Se disolvió Z-pGlu(OSu) (5,4 g, 15 mmoles) en
dioxano (25 ml) y se añadió a una solución de His (2,56
g, 16,5 mmoles) y $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ (4,72 g, 16,5 mmoles) en
20 H_2O (20 ml) a 0°C. Después de agitar durante 2 horas a
temperatura ambiente, el éster activo había reaccionado
completamente (seguido por cromatografía de capa delgada).
La mezcla se concentró a la mitad de su volumen en vacío,
se enfrió a 0°C y se añadió HCl 3 M (5,5 ml) bajo agita-
ción vigorosa. El material voluminoso precipitado se fil-
25 tró, se lavó con H_2O y se recrystalizó en MeOH/ H_2O (2:5).
Rendimiento 3,5 g (60%, bib. 62%), descompone a 140-160°C,
 R_f (S4) 0,45.

30 c) ESTER BENZILICO DE CARBOBENZOYL-L-(PIRO)GLUTAMIL-L-HIS-
TIDIL-GLICINA

1 (Z-pGlu-His-Gly(OBzl))

Se sintetizó Gly(OBzl).pTos(OH) de un modo similar al descrito por L.Zervas, M.Winitz, J.P. Greenstein en J.O.C. 22, 1515-21 (1957). Así pues, se añadió TEA (77 μ l, 0,5 mmoles) a Z-pGlu-His(OH) (203 mg, 0,5 mmoles) y Gly(OBzl). pTos(OH) (186 mg, 0,5 mmoles) en DMF (5 ml) a 0°C.

Después se añadió a la mezcla DCC (133 mg, 0,55 mmoles) en DMF (2 ml) la temperatura se elevó lentamente hasta la temperatura ambiente, y la mezcla se agitó durante la noche. El DCU precipitado se filtró y después de evaporación del disolvente en vacío, el residuo se disolvió en H₂O (5 ml) y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 2 ml). Después de evaporación del disolvente orgánico, el producto crudo (R_F (Sl) 0,25, UV+, CT +, P+) se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

15 d) L-(PIRO)GLUTAMIL-L-HISTIDIL-GLICINA (pGlu-His-Gly(OH))

El producto crudo de Z-pGlu-His-Gly(OBzl) se disolvió en THF/H₂O (1:1), 20 ml), Pd/C se añadió (100 mg) y se hizo burbujear gas H₂ a través de la solución a presión normal durante 1 hora. La reacción fue seguida por cromatografía de capa delgada, que mostró que se estaba formando un producto más polar. Una vez completada la reacción, el catalizador se separó por filtración y el disolvente se evaporó en vacío, quedando un residuo que se disolvió en H₂O. La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 2 ml), separando así subproductos menos polares. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna con Gel de Sílice KG 60 (0,063 mm a 0,210 mm) y EtOH/H₂O (7:3) como disolvente de elución. El rendimiento

1- de producto cromatográficamente puro fue de 104 mg (64%).
R_p(S4) 0,45.

5 El péptido sintético así obtenido ha puesto de manifiesto que es idéntico en cierto número de sistemas cromatográficos al material biogénico que ha sido aislado de orina como se ha descrito aquí antes. Se ha encontrado también que el péptido sintético posee una actividad biológica semejante.

10 Los Ejemplos farmacéuticos siguientes se proporcionan únicamente a título de ilustración. La expresión "Péptido" se refiere al péptido de fórmula (I) de esta Memoria.

Ejemplo A Preparación para inyección subcutánea

15 Se llena en viales a dos concentraciones diferentes, péptido liofilizado.

Cada vial contiene:

Péptido 0,05 mg ó 0,10 mg

Glicina 5,0 mg

20 Los contenidos de cada vial se disuelven en 1 ml de cloruro sódico isotónico para inyección, antes del uso.

Ejemplo B Tabletas

Cada tableta contiene:

Péptido 0,1 mg

Almidón de maíz 24,0 mg

25 Lactosa 80,0 mg

Gelatina 1,4 mg

Talco 6,0 mg

Estearato de magnesio 0,6 mg

Ejemplo C Solución de gotas nasales o nebulización nasal

Cada 1,0 ml de solución contiene:

1	Péptido	0,5 mg ó 1,0 mg
	Cloruro de sodio	4,6 mg
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,2 mg
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	14,3 mg
5	Cloruro de benzalconio	0,125 mg
	Agua estéril c.s.p.	1,0 ml

1 dosis, es decir, 2-3 gotas (o nebulización equivalente) contiene 0,05 mg ó 0,10 mg de péptido.

Ejemplo D Supositorios

10	Cada supositorio contiene:	
	Péptido	0,1 mg ó 0,2 mg
	Adeps solidus (Witepsol H.15)	1,8 g

Ejemplo E Supositorios

15	Cada supositorio contiene:	
	Péptido	0,1 mg ó 0,2 mg
	Polietilenglicol 1500	1,2 g ó 1,1 g
	Polietilenglicol 3000	0,5 g
	Agua destilada	100,0 mg.

Ejemplo F Solución rectal

20	Composición por rectiola:	
	Péptido	0,1 mg ó 0,2 mg
	Fenil carbinol	15,0 mg
	Metil celulosa	40,0 mg
25	Agua estéril c.s.p.	2,0 ml

1

REIVINDICACIONES

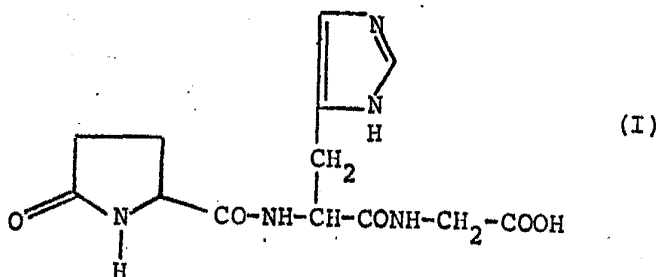
5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

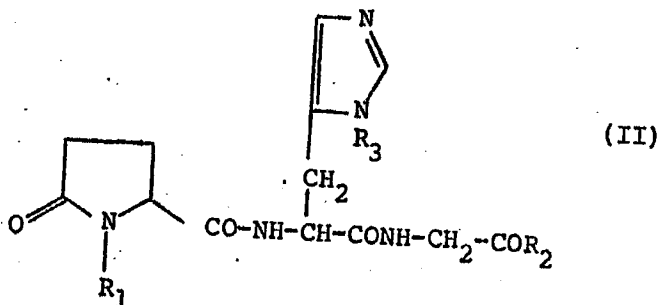
1a.- Un procedimiento para la preparación de L-(piro)glutamil-L-histidil-glicina de fórmula:

15



(en la que los restos de piroglutamilo e histidilo son de la serie I), y sus sales, que comprende dejar sin protección un compuesto de fórmula:

20



25

(en donde los restos de piroglutamilo e histidilo son cada uno de la serie I, cada uno de R_1 y R_3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de grupos amino, y R_2 representa un grupo hidroxilo o un grupo protector de

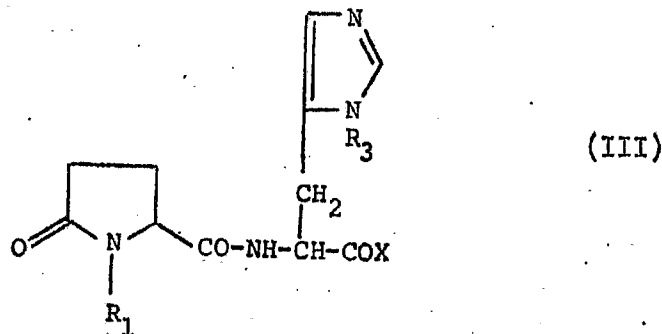
30

30049

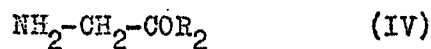
**POOR
QUALITY**

1 grupos carboxilo, con la condición de que por lo menos uno
 1 de R_1 , R_2 y R_3 representará un grupo protector), con lo que
 se obtiene L-(piro)glutamil-L-histidil-glicina o una de sus
 sales.

5 2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
 en el que el compuesto de fórmula II se prepara primeramen-
 te haciendo reaccionar un compuesto de fórmula:



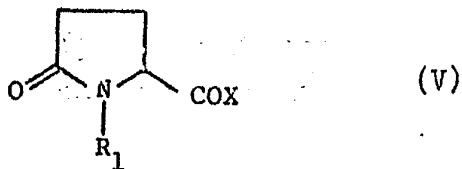
15 (en la que los restos de piroglutamilo e histidilo son ca-
 da una de la serie L, cada uno de R_1 y R_3 representa un
 átomo de hidrógeno o un grupo protector de grupos amino, y
 X representa un grupo hidroxilo o un grupo activador de
 ácidos carboxílicos) con un compuesto de fórmula:



(en donde R_2 representa un grupo hidroxilo o un grupo pro-
 tector de grupos carboxilo), con la condición de que por lo
 menos uno de R_1 , R_2 y R_3 representa un grupo protector, con
 25 lo que se obtiene un compuesto de fórmula II según se ha
 definido en la reivindicación 1ª.

3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª,
 en el que el compuesto de fórmula II se prepara primeramen-
 te haciendo reaccionar el isómero L de un compuesto de fór-
 mula:

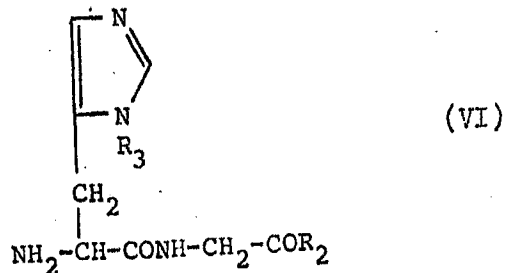
1



5

(en la que R_1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de grupos amino, y X representa un grupo hidroxilo o un grupo activador de ácidos carboxílicos) con el isómero I de un compuesto de fórmula:

10



15

(en donde R_2 representa un grupo hidroxilo o un grupo protector de grupos carboxilo y R_3 representa hidrógeno o un grupo protector de grupos amino), con la condición de que por lo menos uno de R_1 , R_2 y R_3 represente un grupo protector, con lo que se obtiene un compuesto de fórmula II según la reivindicación 1ª.

20

4ª.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en el que se usa un compuesto de fórmula II, III, V y/o VI en donde R_1 y/o R_3 representa un grupo carbobenzoxy, t-butoxicarbonilo o acilo.

25

5ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 3ª, en donde se usa un compuesto de fórmula II, IV y/o VI, en donde R_2 representa un grupo bencilo, p-nitrobencilo o t-butilo.

30

6ª.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2ª a 4ª, en el que se usa un compuesto

30049

**POOR
QUALITY**

1 de fórmula III o V en donde X representa un éster p-nitro-
fenílico, un éster 2,4,5-tricloro-fenílico o un grupo éster
de N-hidroxisuccinimídilo.

5 7ª.- Un procedimiento según una cualquiera de las
reivindicaciones 1ª a 6ª, en el que el compuesto de fórmula
I obtenido se convierte en una sal del mismo.

8ª.- Un procedimiento para la preparación de L-
-(piro)glutamil-L-histidil-glicina.

10 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede
y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de VEINTICINCO hojas escritas
a máquina por una sola cara.

Madrid, 02 MAY 1979
P.A.

15 **Alberto de Elzaburu**
Por **Boletín**



20

25

30