

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO	⑩ A1
	⑫ FECHA DE PRESENTACION	
	474.558	
	26-10-78	

**PATENTE DE INVENCION**

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

⑤⑥ PRIORIDADES:	⑤② FECHA	⑤③ PAIS
⑤① NUMERO		
P 27 48 294.6	27 de octubre de 1.977	Rep. Federal Alemana

④⑦ FECHA DE PUBLICIDAD	④⑧ CLASIFICACION INTERNACIONAL	④⑨ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07G;A61K	

④⑤ TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA PANCREATICA BASICA.

④① SOLICITANTE (S)
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.

④② INVENTOR (ES)
Dr. Eugen Schnabel., Gerd Reinhardt, Prof. Dr. Harst Dieter Schlumberger., Dr. Hans-Georg Opitz., Dr. Ernst Truscheit, Prof. Dr., Harald Tschesche

④③ TITULAR (ES)

④④ REPRESENTANTE
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

La presente invención se refiere a nuevos derivados del inhibidor tripsina-callicreina de órganos animales, preferentemente de órganos de reses (denominado a continuación BPTI, es decir "basic pancreatic trypsin-inhibitor"); a un procedimiento para su obtención por reacción de BPTI o derivados de BPTI con grupos carboxilo libres, con carbodiimida, y en caso dado, a continuación, desamidización o copulación azóica con sales diazóicas. La invención se refiere además al empleo de estos nuevos derivados de BPTI como medicamentos, especialmente como medicamentos cuyo efecto se basa en una función inhibidora de la proteasa.

Ya es conocido que el BPTI [H. Kraut, E. K. Frey, E. Werle, Z. Physiol. Chem. 189, 97 (1930)], también denominado inhibidor de Kunitz [M. Kunitz, H.H. Northrop, J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936)], inhibe una serie de enzimas fisiológicamente importantes, tales como por ejemplo quinínofenina (quininogenasas), plasmina, quimotripsina y tripsina (E. Werle en W. Brendel, G.L. Haberland: Neue Aspekte der Trasylol-Therapie, 5, 9, F. K. Chatauer-Verlag Stuttgart-New York 1972; H. Fritz, H. Tschesche, L.J. Greene, E. Truscheit (Hrsg): Proteinase Inhibitors (Bayer Symposium V), Proc. 2nd International Research Conference, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974). El BPTI se emplea como aprotinina (nombre genérico) para la terapia y profilaxis de estados de shock así como para la profilaxis de complicaciones post-operativas y post-traumáticas.

Es conocido que los grupos carboxilo de las proteínas pueden reaccionar con los grupos amino de las proteínas durante la reacción con carbodiimidias bajo reticulación intra- y/o intermolecular [J.C. Cheehan y J.J. Hlavka, J. Amer. Chem. Soc. 79, 4528 (1957)]. Además se ha observado la formación

de derivados de acilúrea de las proteínas bajo las mismas condiciones. [J.P. Riehm y H.A. Scheraga, Biochemistry 5, 99 (1966)].

5 Se ha descubierto que se obtienen nuevos derivados del BPTI, en el cual están modificados una parte o todos los grupos carboxilo del BPTI de origen natural o de sus derivados que contienen grupos carboxilo, si el BPTI ó los derivados de BPTI con grupos carboxilo libres se hacen reaccionar con carbodiimidaz en medio acuoso, o medio que contenga agua, bajo  
10 valores pH entre 3 y 11, los productos de reacción formados, en caso dado, se aislan y, en caso dado, a continuación se desaminiza ó en caso dado se transforma en su derivado azóico. Además, se ha descubierto que los nuevos derivados de BPTI de la presente invención tienen efectos inhibidores muy destacados.

15 La reacción de BPTI y de los derivados de BPTI arriba indicados con carbodiimida se efectua preferentemente a valores pH entre 4,5 y 7,5 en solución acuosa que, sin embargo, también puede contener disolventes orgánicos y/o sales y/o desnaturalizantes.

20 La reacción según la presente invención se efectua preferentemente a temperaturas entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $+50^{\circ}\text{C}$ , en especial entre  $0^{\circ}\text{C}$  y  $30^{\circ}\text{C}$ .

Por mol de BPTI o bien derivado de BPTI se emplean 10-100 moles, preferentemente 30 hasta 60 moles de carbodiimida.

25 Las mezclas resultantes de las reacciones se pueden, opcionalmente, fraccionar mediante procesos conocidos, por ejemplo, por electroforesis, filtración de gel o cromatografía de intercambio de iones.

30 Como carbodiimidaz se pueden emplear en la reacción según la presente invención, para la obtención de los com-

puestos de la presente invención, una serie de carbodiimidas, preferentemente carbodiimidas orgánicas hidrosolubles, habiéndose destacado como especialmente adecuadas las siguientes carbodiimidas para la realización del procedimiento de la presente invención:

diciclohexilcarbodiimida,

N-ciclohexil-N'-[2-(4-morfolinil)-etil]-carbodiimida-metotolueno-4-sulfonato,

hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida,

N-terc.-butil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida,

hidrocloruro de N-ciclohexil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida,

hidrocloruro de N-isopropil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida,

N-ciclohexil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida-metotolueno-4-sulfonato,

N,N'-diisopropil-carbodiimida,

N,N'-di-para-tolil-carbodiimida.

En el procedimiento de la presente invención para la reacción de BPTI o bien derivados de BPTI con carbodiimidas se efectúa la elaboración del producto de reacción, preferentemente, separando primero los componentes de bajo peso molecular de la mezcla de reacción por filtración de dicha solución de reacción a través de columnas adecuadas (por ejemplo columnas de Sephadex<sup>®</sup> G 10), preferentemente con ácidos o con soluciones salinas o bien con amoníaco acuoso como aluyente. Como eluyentes sean mencionados especialmente el ácido acético y la solución de bicarbonato amónico. Los eluados conteniendo proteínas se secan preferentemente por congelación y a continuación se cromatografían para la separación de los componentes

de mayor peso molecular en una columna adecuada.

5 Como columnas adecuadas entran preferentemente en consideración las siguientes columnas: dextranos transversalmente ramificados, columnas de agarosa, columnas de poliacrilamida, tratándose en todos los casos de tamices moleculares y/o intercambiadores de iones. Eluyentes son, a su vez, preferentemente los ácidos y las soluciones salinas, especialmente el ácido acético, las soluciones tampón, tales como acetato amónico y fosfato sódico en mezcla con sal común.

10 Además, los nuevos derivados del BPTI de la presente invención se obtienen desaminizando total o parcialmente a continuación los derivados obtenidos por la reacción del BPTI o de sus derivados con carbodiimidas. Para ello se hacen reaccionar los derivados con agentes suministradores de iones nitrosilo, tales como sales, ésteres o anhídridos mixtos del 15 ácido nitroso en solución acuosa, en caso dado en presencia de aditivos, en sistema heterogéneo y homogéneo. Alternativamente se puede realizar la desaminización ulterior también por reacción de los derivados con compuestos diazonium no copulantes 20 adecuados. Como compuestos diazonium no copulantes sea mencionada la sal diazonium obtenida de 5-aminotetrazol por reacción con nitrito.

25 Además, los nuevos derivados del BPTI de la presente invención se obtienen por copulación de los derivados obtenidos por reacción de BPTI o de sus derivados que contienen grupos carboxilo libres con carbodiimidas, a continuación con 30 compuestos diazonium en solución acuosa que, en caso dado, puede contener también disolventes orgánicos, tales como por ejemplo piridina, quinolina, dimetilformamida, sulfóxido dimetílico o hexametilfósforotriamida, y/o aditivos, tales como sa-

les, por ejemplo, hidrocioruro de guanidina o cloruro de litio y/o no -electrolitos, tales como por ejemplo úrea, obteniéndose derivados azo-BPTI.

5 Las reacciones de copulación se realizan, según la reactividad de los compuestos diazonium a valores pH entre 1 y 12, preferentemente a un pH entre 5 y 10, reuniéndose las soluciones del BPTI o de los derivados del BPTI en agua o en los disolventes arriba mencionados que, en caso dado, pueden contener los aditivos arriba indicados, con soluciones de 10 sal de diazonium. El pH de la mezcla de reacción se ajusta mediante adición de óxidos de metal alcalino o bien de metal alcalinotérreo, hidróxidos, carbonatos, hidrogenocarbonatos de metal alcalino o bien alcalinotérreo o aminas terciarias, tales como por ejemplo trietilamina, N-metilmorfolina, trietanolamina o piridina, y se mantiene constante. Las reacciones 15 se pueden realizar, sin embargo, también en soluciones tampón, especialmente tampones de fosfato o borato. Las velocidades de reacción se pueden regular convenientemente a través del pH de la mezcla de reacción.

20 El punto final de la reacción se puede determinar, por ejemplo, por reacción de puntos, en el que una muestra de la solución de reacción se hace reaccionar con 1-(2-aminoetilamino)-naftalina como componente de copulación.

25 Durante las reacciones de copulación se mantienen las temperaturas de las mezclas de reacción entre  $-15^{\circ}\text{C}$  hasta  $30^{\circ}\text{C}$ , preferentemente entre  $0^{\circ}\text{C}$  y  $10^{\circ}\text{C}$ . Bajo circunstancias es conveniente efectuar la copulación primeramente a temperaturas entre  $0^{\circ}\text{C}$  y  $4^{\circ}\text{C}$  y a continuación elevar la temperatura hasta a  $25^{\circ}\text{C}$ . El compuesto diazonium en exceso se puede ligar, en caso 30 dado, antes de la elaboración de la mezcla de reacción, por ejem

5 plo, por adición de fenol a la solución de reacción. La proporción molar entre los compuestos diazonium y el derivado de BPTI empleado asciende a 1:1 hasta 10:1, preferentemente 1:1 hasta 5:1, encontrándose las concentraciones en derivados de BPTI en las soluciones empleadas para la copulación entre un 1 y 30%, preferentemente entre un 5 y 15%.

10 Como componentes azóicos son adecuados para la obtención de los derivados de azo-BPTI de la presente invención los compuestos diazonium mononucleares o polinucleares, aromáticos, así como heterocíclicos, que se obtienen de las correspondientes aminas. Estos pueden contener asimismo uno o varios sustituyentes. Especialmente son adecuados los derivados de la anilina, por ejemplo, alquilanilinas, alcoxianilinas, los derivados de halógeno de la anilina, nitroanilinas, cianoanilinas, trifluormetilánilinas, acetaminoanilinas, aminoacetofenonas, ácidos aminobencenosulfónicos, ácidos anilindisulfónicos, ácidos aminobencenoarsónicos, ácidos aminobenzóicos, aminodifeniléter; como aminas polinucleares son especialmente adecuadas la  $\alpha$ - y  $\beta$ -naftilamina, así como sus derivados, por ejemplo, los ácidos aminonaftalinsulfónicos.

20 Como heterocícllos se pueden emplear especialmente el aminotriazol y los aminofeniltriazoles, que también pueden estar sustituidos.

25 La diazotación de las aminas empleadas en la azocopulación según la presente invención se efectúa según procedimientos usuales  $\sqrt{R}$ . Pütter, en "Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie", tomo 10/3, páginas 1 y siguientes., Hrsg. E. Müller bajo colaboración de O. Bayer, H. Meerwein y K. Ziegler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1965] por reacción con 30 compuestos suministradores de iones nitrosilo especialmente

nitrito sódico en solución ácido mineral o suspensión, en caso dado en presencia de disolventes orgánicos, especialmente de dimetilformamida, ácido acético o ácido propiónico, a temperaturas desde  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta  $50^{\circ}\text{C}$ , preferentemente  $-5^{\circ}\text{C}$  hasta  $20^{\circ}\text{C}$ , o también con ácido nitrosilsulfúrico o bien cloruro nitrosílico en mezclas de ácido acético-ácido propiónico bajo adición de ácidos minerales a temperaturas alrededor de preferentemente  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta  $0^{\circ}\text{C}$ . La duración de la diazotación es muy variable; depende de la solubilidad de las aminas así como de sus posibilidades de sustitución y oscila entre pocos minutos y varias horas. Los iones de nitrosilo en exceso se destruyen, después de la diazotación, por reacción con ácido amidosulfónico o úrea para evitar una desaminación de los derivados de BPTI por los iones nitrosilo, tal y como es posible en la realización de las copulaciones en medio ácido.

En la copulación de los derivados de BPTI con los compuestos diazonium se obtienen mezclas de distintos componentes. La composición de estas mezclas de derivado de azo-BPTI se puede regular mediante la selección de las condiciones de reacción, especialmente a través de la proporción del derivado de BPTI empleado para la copulación y el compuesto diazonium, el pH de las mezclas de reacción, la duración de la reacción, así como por los aditivos a las soluciones de reacción arriba mencionados.

Como ya se ha mencionado más arriba, se emplean como productos de partida para la obtención de los compuestos modificados por carboxilo según la presente invención el BPTI y los derivados de BPTI con grupos carboxilo libres.

Como productos de partida sean mencionados, además del BPTI, por ejemplo:

1. los derivados de desamino-BPTI que pueden estar total o parcialmente desaminados y/o llevar en uno de los dos restos 10 ó 21 tirosina un grupo nitro en la posición orto con respecto al grupo hidroxilo fenólico; también pueden contener el resto 10 y/o 21 tirosina un grupo amino en la posición orto con respecto al grupo hidroxilo fenólico. Se obtienen del BPTI o de los derivados del BPTI según uno de los procedimientos siguientes:

a) reacción del mismo en solución ácida de agentes suministradores de iones de nitrosilo, tales como nitritos alcalinos o alcalinotérreos, ésteres del ácido nitroso o anhídridos mixtos del ácido nitroso, en caso dado en presencia de aditivos, por ejemplo, de aquellos que influyen en la conformación de proteínas (por ejemplo disolventes orgánicos, detergentes o hidrocioruro de guanidinium) en sistema heterogéneo o en sistema homogéneo y elaboración de la mezcla de reacción según métodos en sí conocidos. Se obtienen así mezclas de derivados de BPTI de diferente grado de desaminización, de los cuales una parte también ha sido nitrada en los restos 10 y/o 21 tirosina. Esta nitración se puede inhibir si la reacción de desaminación se efectúa bajo un gas inerte o en vacío y/o se agrega un aceptor para la electrofilia, por ejemplo, fenol. Durante la elaboración se puede evitar la nitración por alcalinación de la mezcla de reacción.

b) reacción del mismo en solución ácida, neutra, o debilmente alcalina con compuestos diazonium que se obtienen por diazotación de aminas heterocíclicas, especialmente de 5-aminotetrazol, y elaboración de la mezcla de reacción según métodos en sí conocidos. A los preparados de reacción se les pueden agregar en caso dado aditivos, tales como por ejemplo disolventes or-

gánicos, detergentes, hidrocioruro de guanidinium. Se obtienen así mezclas de derivados de BPTI de diferente grado de desaminación, en comparación con la variante a), considerablemente inferiores, de cuyos espectros de absorción se puede apreciar que ni sus restos tirosina se han transformado en derivados azóicos, ni sus grupos amino primarios en triazenos.

2. Desamido-BPTI, obtenido por un largo reposo (20-30 días) de BPTI de origen natural en ácido acuoso (preferentemente ácido clorhídrico 2-n) a temperatura ambiente.

3. Mononitro-BPTI, obtenido según B. Meloun et al. Europ. J. Biochem, 4, 112 (1968) por nitración directa del BPTI con tetranitrometano, o, según la presente invención, con ácido nítrico.

4. Dinitro-BPTI, asimismo, obtenido según B. Meloun et al. Europ. J. Biochem. 4, 112 (1968) ó, según la presente invención con ácido nítrico.

5. Derivados del BPTI que en los restos 10 y/o 21 tirosina llevan grupos amino y se pueden obtener de los derivados según 3 y 4 por reducción según métodos en sí conocidos, por ejemplo, según M. Sokolovsky et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 20 (1967).

6. BPTI guanidizada, obtenida según B. Kassell et al. Biochemistry 5, 3449 - 3453.

7. Derivados acíclicos del BPTI obtenidos del BPTI por reacción con derivados del ácido carboxílico activados así como otros derivados del BPTI, con grupos carboxilo aún libres.

Los derivados de BPTI según la presente invención inhiben, contrario al BPTI, las elastasas del páncreas y granulocitos, En comparación con otras proteasas, tales como quimotripsina, calicrecina del páncreas, calicreina del plasma,

plasmina, catepsina G y tripsina se diferencian los espectros de inhibición de los distintos derivados cualitativa y/o cuantitativamente del espectro del BPTI. En la inhibición de la elastasa no se trata del bloqueo del sustrato descrito por J. Pütter y G. Schmidt-Kastner, *Biochem. Biophys. Acta* 127, 538 (1966), que solo se realiza con concentraciones de BPTI muy altas, sino de una inhibición de la enzima.

Este efecto inhibitor de la elastasa resulta más sorprendente debido a que, según el actual estado de la técnica,  $\bar{D}$ . M. Blow, C.S. Wright, D. Kukla, A. Rühlmann, W. Steigemann y R. Huber, *J. Mol. Biol.* 69, 137 (1972); R. Huber, D. Kukla, W. Steigemann, J. Deisenhofer y A. Jones en H. Fritz, H. Tschesche, L. J. Greene y E. Truscheit (Hrsg), *Proteinase Inhibitors (Bayer Symposium V) Proc. 2nd Intern. Res. Conference*, página 484, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974<sup>7</sup>, se desprende que el BPTI se incorpora en forma de sustrato con su centro activo (resto lisina-15) en la bolsa de especificidad de las enzimas inhibibles y con ello bloquea la actividad enzimática. Tampoco cuando la cadena lateral del resto lisina-15 en algunos derivados de la presente invención está desaminado era de esperar, según el actual estado de los conocimientos, que se ajustase en la bolsa de especificidad relativamente pequeña de las elastasas (D. Shotton en H. Fritz y H. Tschesche (Hrsg), *Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors*, página 47, Walter de Gruyter, Berlin-New York 1971).

Los derivados de BPTI de la presente invención son nuevos. Se pueden caracterizar y diferenciar de las sustancias conocidas por sus propiedades químicas, fisicoquímicas, bioquímicas y biológicas. Se aplicaron los siguientes criterios:

1) Composición del aminoácido

La composición del aminoácido se determinó según S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein, Anal. Chem. 30, 1185 (1958). La tabla 1 refleja los contenidos de aminoácidos característicos para algunos otros derivados de BPTI modificados por carboxilo. Además, de la tabla se desprende como se ha modificado el contenido de estos aminoácidos después de una reacción de copulación o desaminización ulterior.

TABLA 1.-

Contenido de aminoácidos característicos determinados para algunos derivados de BPTI modificado con carboxilo por análisis de aminoácidos (moles/mol de derivado)<sup>1)</sup>

Derivado de BPTI según el ejemplo	Obtenido del derivado de BPTI según el ejemplo	Gly <sup>2)</sup>	Ala <sup>2)</sup>	Tyr	Lys	Arg
BPTI <sup>3)</sup>	-	6,09	6,00	3,89	4,08	6,01
1	-	5,78	5,91	3,90	4,01	5,95
4	1	5,64	5,45	3,87	0,32	5,09
5	1	5,21	5,82	1,71	3,77	5,97
6	1	5,22	5,48	2,51	2,95	5,13

1) el peso molecular de los derivados se supuso como para el BPTI en 6511.

2) el contenido en Gly o bien Ala sirve como standard interno.

3) como comparación se recogieron en la tabla los valores de los aminoácidos para BPTI. Los valores teóricos ascienden: Gly, Ala y Arg en cada caso 6, Tyr y Lys en cada caso 4.

2) Propiedades electroforéticas.

Electroforesis de celogel:

Para las electroforesis de celogel se emplearon tiras de acetato de celulosa de 2,5 cm de ancho de la firma Serva bajo las condiciones usuales  $\sqrt{J}$ . Kohn, Cellulose Acetate

Electrophoresis and Immuno-Diffusion Techniques in I. Smith, Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol, II, W. Heinemann, Ltd., London and Interscience Publishers 56-90 (1960) Gelman Procedures, Techniques, and Apparatus for Electrophoresis; Gelman Instrument Company (1968)7. El tampón de piridina-acetato del pH 6,05 empleado se obtuvo completando una mezcla de 200 cc de piridina y 20 cc de ácido acético glacial con agua a un volumen de 2 litros. Las separaciones se realizaron a 150 V con una intensidad de corriente de 0,8mA/cm de ancho de tira simultáneamente con BPTI como standard para comparación. Para teñir las tiras se empleó una solución de 5 g de negro amido en una mezcla de 900 cc de metanol y 100 cc de ácido acético glacial.

#### Electroforesis de disco:

Las electroforesis de disco se efectuaron en un gel separador al 15% con 0,03 m de tampón de imidazol del pH 7,1 como tampón de ánodo y 0,03 m de ácido  $\epsilon$ -aminocapróico, 0,01 m de tampón de imidazol del mismo pH como el tampón del cátodo. La intensidad de corriente ascendió a 2,5 mA por tubo; la separación se terminó tan pronto como el colorante marcador (verde de metilo) se había trasladado totalmente a través del gel. Después de la separación se tiñeron los geles en una solución al 0,1% de negro de amido en ácido acético al 7% durante 30 minutos. El colorante en exceso se retiró de nuevo a continuación con ácido acético al 7%.

En los ejemplos se ha indicado como movilidad electroforética relativa en cada caso el cociente del trayecto de traslación del correspondiente derivado de BPTI y del trayecto de traslación del BPTI. El signo indica el sentido de traslación. El signo negativo significa por lo tanto movilidad ca-

tódica.

3) Espectros de absorción.-

Para la ulterior caracterización de los derivados de BPTI según la presente invención son especialmente adecuados en los compuestos que obtienen grupos azóicos y/o nitro los espectros de absorción. Para algunos derivados se han indicado los datos característicos en los ejemplos en cuestión.

4.- Espectros de inhibición de proteasas.-

a) Inhibición de elastasa

∞ Inhibición de elastasa del páncreas

Para los ensayos de inhibición con los derivados de BPTI según la presente invención se empleó elastasa de páncreas (cerdo) cristalizada, de la firma Nutritional Biochemicals Corp. Como sustratos se emplearon elastin-rojo de congo [M.A. Naughton y F. Sanger, Biochem. J. 78, 156 (1961)], elastina soluble [S. Keller y I. Mandl, Biochem. Med. 5, 342 (1971)] así como succinil-L-alanil-L-alanil-L-alanin-p-nitroanilida [J. Bieth, B. Spiess y C.C. Wermuth, Biochem. Med. 11, 350 (1974)]. El sustrato de péptido sintético permite una determinación colorimétrica sencilla de la actividad enzimática empleada en el ensayo. El empleo de elastasa ascendió en el ensayo de elastina-rojo de congo aproximadamente a 1,1 nkat (veáse Enzyme Nomenclature, Recommendations (1972) of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry, 1973, Elsevier Amsterdam-New York, páginas 26-27); con elastina soluble como sustrato y asimismo con succinil-L-alanil-L-alanil-L-alanil-p-nitroanilida se preparon aproximadamente 0,25 nkat de elastasa por preparado de ensayo. Para la determinación cuantitativa de la inhibición de elastasa se mezclaron las cantidades de enzima arriba indica-

das con soluciones de inhibidor de concentración definida y se agregó la solución de sustrato. Para asegurar una formación de complejo máxima se incubó previamente en algunos casos la enzima y el inhibidor, antes de la adición del sustrato, durante 15 minutos.

La hidrólisis del sustrato se determinó en el ensayo de elastina-rojo de congo por medición de la extinción a 492 nm de los productos de disociación solubles formados después de un tiempo definido. En el ensayo con elastina soluble se determinó la proporción de hidrólisis por determinación fotométrica de los productos de disociación teñibles con ninhidrina que se han disuelto después de un tiempo definido. Al emplear succinil-L-alanil-L-alanil-L-alanin-p-nitroanilida como sustrato se determinó la hidrólisis por medición continua de la extinción de la p-nitroanilina liberada a 410 nm. Los valores de inhibición (expresado en porcentaje de inhibición) se determinaron restando la reactividad residual de elastasa medida después de la adición del inhibidor de la actividad del control de enzima. Los valores de inhibición de algunos derivados de BPTI según la presente invención figuran en la tabla 2.

#### β) Inhibición de elastasa de granulocitos.

La mezcla de isoenzimas empleada para los ensayos de inhibición se obtuvo según K. Ohlsson e I. Olsson [Europ. J. Biochem, 42, 519 (1974)] de granulocitos humanos. Como sustrato es especialmente adecuada la succinil-L-alanil-L-alanil-L-alanin-p-nitroanilida [J. Bieth, B. Spiess und C. G. Wermuth, Biochem. Med. 11, 350 (1974)]. Los valores de inhibición de algunos derivados de BPTI están recogidos en la tabla 2; el empleo de enzimas ascendió a 0,2 nkat por ensayo. Los va-

lores de inhibición son valores absolutos y no están referidos al BPTI. Se determinaron como se ha indicado para la elastasa del páncreas.

b) Inhibición de quimotripsina.

Para la determinación de la actividad de quimotripsina sirvió el succinil-L-fenilalanin- $\beta$ -naftiléster en un tampón tris 0,25 m del pH 7,2 que era de 5 m M con respecto al cloruro de calcio como sustrato. El  $\beta$ -naftol formado en la disociación se determinó fotométricamente en 329 nm.

2 mg de  $\alpha$ -quimotripsina cristalizada se disolvieron en 5 cc de ácido clorhídrico 0,001-n que era 5 m M con respecto al cloruro de calcio y 0,5 cc de esta solución se completaron con 0,25 m de tampón tris del pH 7,2 (véase más arriba) a 10 cc. 50  $\mu$ l de la solución enzimática así obtenida se agregó a 2,35 cc del tampón tris 0,25 m, y esta solución se mezcló para el control de las enzimas con 100  $\mu$ l de agua, para el ensayo de inhibición, sin embargo, con 100  $\mu$ l de una solución de derivado de BPTI con contenido conocido. Después de mezclar bien y una fase de equilibración de 15 minutos ó, en caso dado, también sin incubación previa, se agregaron 25  $\mu$ l de la solución del sustrato. La solución de sustrato se preparó por disolución de 39,1 mg de succinil-L-fenilalanin- $\beta$ -naftiléster en 1 cc de sulfóxido dimetílico. El porcentaje de la inhibición producido por el inhibidor se calculó según la ecuación siguiente:

$$\frac{1 - \Delta OD \text{ preparado inhibidor}}{\Delta OD \text{ control}} \cdot 100 = \% \text{ de inhibición}$$

corrigiéndose la densidad óptica por la proporción de  $\beta$ -naftol implicada por hidrólisis espontánea del naftiléster.

Los valores de inhibición indicados en la tabla 2 para algunos derivados del BPTI se refieren a la inhibición (= 100%) producida por la misma cantidad de BPTI.

c) Inhibición de catepsina-G.

La enzima se aisló según un procedimiento combinado según J.R. Baugh y J. Travis [Biochemistry 15, 836 (1976)] y según W. Schmidt y K. Havemann [Z. Physiol. Chem 355, 1077 (1974)]. La determinación de la actividad se efectuó, como descrito para la quimotripsina, con succinil-L-fenilalanin- $\beta$ -naftiléster como sustrato en un tampón tris 0,25 m del pH 7,2 que contenía 0,01% de Brij (R) y 0,005 moles/litro de cloruro de magnesio. La cantidad de enzima empleada ascendió a 0,25 nkat por ensayo. El cálculo del porcentaje de la inhibición se realizó como descrito bajo b).

d) Inhibición de quininogenasas.

$\alpha$ ) Inhibición de quininogenasas de plasma.

La actividad de las quininogenasas se determinó según la publicación alemana DOS 25 27 932 del 22.1.76, inventor L.G. Svendsen, Pentapharm AG., Basel, con benzoil-L-propil-L-fenilalanil-L-arginin-p-nitroanilida como sustrato con una cantidad de 0,1 nkat de enzima por ensayo. La mezcla de las isoenzimas se aisló según C. Sampaio et al. [Arch, Biochem. Biophys. 165, 133 (1974)] por cromatografía de afinidad de la fracción de plasma humano Cohn IV-1. Los valores inhibidores mencionados en la tabla 2 para algunos derivados de BPTI se calcularon como indicado para la inhibición de la quimotripsina

$\beta$ ) Inhibición de la quininogenasa del páncreas

La enzima de ensayo se obtuvo según C. Kutzbach y G. Schmidt-Kastner [Z. Physiol. Chem. 353, 1099 (1972)], y las determinaciones de la actividad se realizaron según los

mismos autores (veáse más arriba). La cantidad de enzima empleada ascendió a 10 nkat por ensayo. Los valores de inhibición mencionados en la tabla 2 para algunos derivados de BPTI se calcularon como indicado para la inhibición de la quimotripsina.

e) Inhibición de plasmina.-

La actividad anzimática de plasmina se determinó con azocaseína. Como enzima se empleó plasminogeno activado con uroquinasa que se obtuvo mediante cromatografía de afinidad [D.G. Deutsch, E.T. Merz; J. Med. 3, 224 (1972)] de plasma humano.

La obtención del sustrato y el principio del ensayo se han descrito en los trabajos de P. M. Starkey, A.J. Barrett; Biochem. J. 155, 255 (1976). Para cada determinación se hacen dos preparados A y B, cada uno con 0,6 CU de plasmina, disuelto en 1,0 cc de tampón (0,1 M tris-(hidroximetil)-aminoetano, 0,05 M de NaCl, ajustado a un pH de 7,2 con HCl). Ambos preparados contienen cada uno 1,25  $\mu$ g de BPTI o bien derivado de BPTI, disueltos en 1,25 cc de tampón (veáse más arriba); como comparación sirve, en cada caso, un preparado A y B con 1,25 cc de tampón en lugar del inhibidor. Todos los preparados se incuban durante 10 minutos a 37°C y después se agrega en cada caso 0,45 cc de una solución al 2% de azocaseína (en tampón, véase más arriba). La serie A se mezcla directamente después con 0,3 cc de solución al 30% de ácido tricloroacético (TCA); la serie B se incuba durante 60 minutos a 37°C y después se mezcla con 0,3 cc de TCA. Los preparados se centrifugan después de unos 20 minutos; las extinciones de lo sobrenadante se determina fotométricamente a 340 nm en una cubeta de 1 cm. Como medida de la actividad enzimática vale la

diferencia de extinción de los preparados paralelos A y B ( $\Delta E$ ).

Si la diferencia de extinción causada por la plasmina sola se designa con  $\Delta E_{100}$  y la diferencia de extinción medida en presencia de inhibidores con  $\Delta E$ , entonces se obtiene la inhibición de la plasmina por los inhibidores bajo las condiciones indicadas por la siguiente expresión

$$\frac{\Delta E_{100} - \Delta E}{\Delta E_{100}} \cdot 100\%$$

Los valores de inhibición (expresados en %) mencionados en la tabla 2 para algunos derivados de BPTI se refieren a la inhibición producida por la misma cantidad de BPTI ( $\hat{=} 100\%$ ).

f) Inhibición de tripsina.-

La determinación de tripsina se efectuó con hidrocloreuro de benzoil-L-arginin-etiléster como sustrato por el procedimiento pH-Stat según R. Ruyssen (Symposium on Pharmaceutical Enzymes and their Assay, Universitaire Pers, Ghent, Belgium 1969, página 110). Los valores de inhibición mencionados en la tabla 2 para algunos derivados de BPTI se determinaron como indicado bajo la inhibición de quimotripsina.

TABLA 2.-

Inhibición de algunas proteasas de serina por los derivados de BPTI.

Deriva- dos de BPTI se- gún el ejemplo	Quimo- tripsi- na	Catep- sina G	Elas- tasa (pán- creas)	Enzima elas- tasa (gra- nulo- cito)	Cali- crei- na (pán- creas)	Cali- crei- na (plas- ma)	Plasmina	Tripsina
BPTI	100	100	0	0	100	100	100	100
1	148	65	0	21	61	92	56	92
4	83	151	93	43	5	7	0	28
6	88	0	19	29	14	55	45	46

Para quimotripsina, catepsina G, las calicreinas, plasma y tripsina se refieren los valores de inhibición indicados a la inhibición producida por la misma cantidad de BPTI (100%). La cantidad de BPTI en el ensayo de inhibición se seleccionó de manera que los valores absolutos de la inhibición ascendiesen a  $50 \pm 10\%$ , excepto en la catepsina G, donde el valor absoluto era de un 20%.

En las elastasas contiene la tabla valores absolutos. Por cada ensayo se emplearon 25  $\mu\text{g}$  de derivado de BPTI. Disposición del ensayo para la demostración del efecto inhibitor de la inflamación en la rata.

a) Reacción de inflamación inducida por caolina.

La reacción de inflamación se indujo por inyección intraplantar de 0,1 cc de una suspensión al 10% de caolina en una pata trasera de ratas de Wistar de 130-160 g de peso. Los derivados de BPTI, según la presente invención, así como el BPTI empleado para el tratamiento de la reacción de inflamación se disolvieron en solución al 0,9% de cloruro sódico en una

concentración de 10-20 mg/cc. El tratamiento de los animales de ensayo se efectuó por inyección intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o intravenosa de 0,5 - 1,0 cc de solución de derivados de BPTI y, como comparación BPTI, bien profilácticamente, es decir, antes de implantar la noxa de inflamación o terapéuticamente, es decir, después de implantar la noxa de inflamación. La hinchazon de la pata infectada, que es una medida para la gravedad de la reacción de inflamación, se siguió temporalmente con el antiflogómetro según Kemper

5

10 [F. Kemper y G. Ameln, Z. ges. exp. Med, 131, 407-411 (1959)]

Para determinar las reacciones entre las dosis y el efecto se empleó el valor medido 4 horas después de la implantación de la noxa de inflamación.

La comparación de la acción de los derivados de BPTI demuestran que en su efecto inhibidor de la inflamación son superiores al BPTI.

15

b) Reacción de inflamación inducida por aerosil.

La reacción de inflamación se indujo por inyección intraplantar de 0,1 cc de una suspensión al 2% de aerosil en una pata trasera de ratas de Wistar de 130-160 g de peso. Los derivados de BPTI según la presente invención o bien el BPTI empleado para el tratamiento de la reacción de inflamación se disolvieron en solución al 0,9% de cloruro sódico en una concentración de 10-20 mg/cc. El tratamiento de los animales de ensayo se efectúa por inyección intraperitoneal, subcutánea o intravenosa de 0,5-1,0cc de solución de derivados de BPTI y, como comparación, BPTI, 15 horas después de la implantación de la noxa de inflamación. La inflamación de la pata infectada, que es una medida para la gravedad de la reacción de inflamación, se siguió temporalmente con el antiflogómetro según

20

25

30

Kemper. Para determinar la relación entre la dosis y el efecto se determinó el valor después de 21 horas después de la inducción de la inflamación (= 6 horas después de la inyección de los derivados de BPTI según la presente invención o bien del BPTI).

El resultado de los ensayos de terapia con los derivados de BPTI según los ejemplos muestra la eficacia de los derivados de BPTI empleados en este modelo experimental donde el BPTI en igual dosificación no inhibe la reacción de inflamación.

Los derivados de BPTI según la presente invención muestran, por lo tanto, unas propiedades terapéuticas extremadamente valiosas. De especial ventaja son sus efectos inhibidores sobre las elastasas del páncreas y los granulocitos, que abren nuevas posibilidades de aplicación terapéuticas.

La elastasa del páncreas tiene un papel importante en la pancreatitis [M. C. Geokas, H. Rinderknecht, V. Swanson, B.P. Vitron y B. J. Haverback, Clin.Res. 16, 285 (1968)]; la elastasa del suero en la arterioesclerosis [U. Butturini y M. Langen, Klin. Wochenschr. 40, 472 (1962)] y la elastasa de los granulocitos en las inflamaciones crónicas y agudas en los daños de los tejidos conyuntivos [A. Janoff, Amer. J. Pathol. 68, 579 (1972)], en los daños de las paredes de los vasos [A. Janoff y J. D. Zeligs, Science 161, 702 (1968)], en las enfermedades necrotizantes y degeneración del tejido pulmonar, por ejemplo, en enfisemas [G. M. Turino. R. M. Senior, B. D. Garg, S. Keller, M.M. Levi y I. Mandl, Science 165, 709 (1969); H. E. Evans, M.M. Levi y I. Mandl, Amer. Rev. Respir. Dis. 101, 359 (1970) así como A. Janoff, R. A. Sandhaus, V. D. Hospelhorn y R. Rosenberg, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 140,

516 (1972) ]. Igual de importante es el papel de las enzimas lisosomales y especialmente de la elastasa de granulocitos en las reacciones de inflamación de causa inmunológica [ M. Koono, M. Muto y H. Hayashi, Tohoku J. Exptl. Med. 94, 231 (1968) ], por ejemplo, de la artritis reumatoide [ G. Weissmann y J. Spilberg, Arthritis Rheumat. 11, 162 (1968) ].

Se ha descubierto que los derivados de BPTI de la presente invención son superiores al BPTI en los modelos de la reacción de inflamación aguda, ya que con ellos no solo se logra el efecto como con el BPTI en una dosificación considerablemente más reducida, sino que la reacción de inflamación se inhibe también en forma significativa cuando se administra varias horas después de la implantación de la noxa de inflamación. Un efecto terapéutico de estos no se logra con la BPTI en el modelo de caolina y aerosil en una sola administración.

Este efecto y eficacia modificado en comparación con el BPTI de los derivados de BPTI según la presente invención se deben al espectro de inhibición modificado y otras propiedades modificadas, tales como mayor duración de permanencia y duración de efecto en el cuerpo de los animales de ensayo. Los derivados de BPTI de la presente invención se han de diferenciar claramente biológicamente del BPTI.

Los nuevos derivados de BPTI de la presente invención se pueden emplear, debido a su eficacia biológica, especialmente para el tratamiento de las siguientes enfermedades o bien síntomas de enfermedades:

1. Distintas formas del shock, complicaciones post-traumáticas y post-operativas.
2. Desordenes en la coagulación de la sangre.
3. Reacciones de inflamación agudas y crónicas, especialmente

para la terapia y profilaxis de daños en órganos, tales como por ejemplo pancreatitis y enteritis producida por rayos.

4. Reacciones de inflamación causadas por complejos de inmunidad, tales Immun-Vasculitis, Glomerulonefritis y Artritis.

5. Colagenosas, especialmente artritis reumatoides.

6. Las artritis originadas por sedimentaciones debidas al metabolismo (por ejemplo, gota).

7. Degeneración de los componentes elásticos de los componentes de los tejidos conjuntivos de órganos, tal como en la arteroesclerosis y enfisema pulmonar.

Las nuevas sustancias activas se pueden transformar en forma conocida (análogo al BPTI) en las formulaciones usuales.

Aquí son de mencionar, preferentemente, las siguientes formulaciones:

1. Soluciones para la aplicación parenteral, por ejemplo, inyección intravenosa, intramolecular y subcutánea y para inyección intraarticular e intratumoral.

2. Soluciones para la infusión continua intravenosa.

3. Soluciones para la aplicación como aerosoles para la inhalación.

4. Soluciones, emulsiones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, polvos para aplicación local exterior.

5. Combinación de distintas sustancias inhibidoras cuyos espectros de eficacia se complementen entre sí.

Las concentraciones de las nuevas sustancias activas en las formulaciones según la presente invención se mueven entre los límites de 0,01 hasta 100 mg/cc de solución, preferentemente entre 0,1 y 10 mg/cc de solución.

Las nuevas sustancias activas se pueden emplear en

la forma usual, siendo de mencionar como preferentes los siguientes métodos de aplicación:

1. Parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intra-articular, intratumoral.

5 2. Local; como aerosol,

3. Oral, eventualmente en forma de aplicación resistentes a los jugos gástricos y/o solubles en el intestino delgado,

Como margen de dosificación se pueden indicar para los nuevos compuestos de la presente invención:

10 0,1 - 40 mg de sustancia activa/kg de peso corporal, preferentemente 1 hasta 25 mg de sustancia activa/kg de peso corporal, la dosificación depende aquí, ante todo, de la especie a tratar, así como de la forma de aplicación.

15 Las nuevas sustancias activas de la presente invención se pueden emplear en el ser humano y en el animal.

Las marcas empleadas en el presente texto de la solicitud tienen los siguientes significados:

Sephadex (R) G 10= Dextrano transversalmente reticulado con un límite de exclusión de peso molecular de 700

20 Sephadex (R) G 50= Dextrano transversalmente reticulado con un límite de exclusión de peso molecular de 30.000.

EJEMPLO 1.-

25 A una solución de 1,3 g de BPTI ( $200 \mu$  moles) en 130 cc de agua se agregan bajo agitación 2,5 g de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (12 m moles) y mediante adición de ácido clorhídrico 1-n se ajusta el pH de la solución a 4,75. Este pH se mantiene constante con ayuda de un autotitrador. Después de 4 horas se reduce el volumen  
30 de la solución de reacción por concentración en vacío a 15cc y

el preparado se filtra, para la separación de los productos de reacción de bajo peso molecular con 0,1 moles de ácido acético como eluyente a través de 100 x 2,5 cm de gel de polidextrano (Columna de Sephadex <sup>(R)</sup> G 10). Los eluados que contienen la proteína se cromatografían después de secar por congelación, para separar las partes de mayor peso molecular (235 mg - 18%) con 0,1 moles de ácido acético en una columna de gel de polidextrano reticulado (Sephadex <sup>(R)</sup> G 50). Se obtienen 1080 mg (82%) de sustancia incolora. En la electrofóresis de celogel demostró ser la sustancia más fuertemente básica que el BPTI. Movilidad electroforética relativa - 1,78 (celogel) o bien - 1,20 (electrofóresis de disco);

$$[\alpha]_{22}^{578} = -105,5^{\circ} \text{ (c = 0,5, en agua).}$$

EJEMPLO 2.-

1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 1,9 g de N-terc.-butil-N'-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida, se hacen reaccionar en 15 cc de agua como descrito en el ejemplo 1 bajo un valor pH de 4,75 y el preparado se elabora en forma correspondiente. Después de cromatografiar el gel de polidextrano reticulado (Sephadex <sup>(R)</sup> G 50) se aísla 145 mg de sustancia polímera (11%) y 1150 mg de sustancia monómera (88%).

Movilidad electroforética relativa: - 1,66 (celogel) o bien -1,18 (electrofóresis de disco); contenido en proteína:76%

$$[\alpha]_{22}^{578} = -84,4^{\circ} \text{ (C = 0,5 en agua)}$$

EJEMPLO 3.-

1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 4,3 g de N-ciclohexil-N'-[2-(morfolinil)-etil]-carbodiimida-meto-p-toluenosulfonato (10 m moles) se disuelven en 60 cc de agua y la solución se agita como descrito en el ejemplo 1 bajo un valor pH de 4,75 y se elabora. Por cromatografía en Sephadex <sup>(R)</sup> G 50

con 0,1 moles de ácido acético como aluyente se obtienen además de 98 mg de sustancia polímera (8%) 940 mg (72%) de sustancia monómera incolora.

Movilidad electroforética relativa: -1,75 (celogel) o bien 1,06 (electroforésis de disco).

$$\left[ \frac{22}{578} \right] = -99,5^\circ \text{ (c = 0,5, en agua)}$$

EJEMPLO 4.-

250 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 1 se disuelven en 100 cc de ácido acético 0,25 m rico en oxígeno. En esta solución se vierten bajo agitación y manteniendo una atmósfera de nitrógeno, a 4°C, en el transcurso de 30 minutos, 25 cc de solución 2-n de nitrito sódico. La mezcla de reacción se agita durante otras 24 horas a 4°C. Después se ajusta el pH de la solución con amoníaco acuoso concentrado a 8,0 y el volumen de la solución se concentra con ayuda de una célula de ultrafiltración a 10 cc. La solución se desala por filtración a través de gel de polidextrano reticulado (Sephadex (R) G 10) con 0,1 m de amoníaco como eluyente. Al liofilizar el eluado que contiene la proteína se obtienen 146 mg (58%) de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: -0,16 (celogel) o bien -0,62 y -0,70 (bandas dobles; electrofóresis de disco);

EJEMPLO 5.-

A la solución de 250 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 1 se vierten bajo agitación a 4°C 100  $\mu$ l de anhídrido de ácido citracóico (1,1 m moles), manteniéndose el pH de la solución en 8,0 mediante adición de lejía sódica 8-n. La mezcla de reacción se agita a continuación durante otros 30 minutos a 4°C y se reúne con una solución preparada de 25 mg de 2,5-dicloroanilina del correspondiente

compuesto diazónico y se copula a un pH de 8,0. La obtención del compuesto diazónico y la copulación se efectúan como descrito a continuación.

La solución de 25 mg de 3,5-dicloroanilina (155  $\mu$  moles) en 0,5 cc de una mezcla 1 + 1 de ácido acético y ácido fosfórico al 80% se mezcla a 4°C bajo agitación con una solución de 25 mg de nitrito sódico (180  $\mu$  moles) en 50  $\mu$ l de agua. Después de 10 minutos se agregan 15 mg de úrea y la solución de reacción se reúne, después de otros 10 minutos, con una solución enfriada con hielo de 250 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 1 en 4 cc de solución 0,1-m de tetraborato sódico. El pH de la mezcla de reacción se ajusta a 8,0 mediante adición de lejía sódica 8-n enfriada con hielo, con lo que se forma un precipitado. Después de agitar durante una hora a 4°C se agregan 25 mg de fenol a la mezcla y ésta se diluye finalmente con 8 cc de ácido acético glacial. La solución intensamente roja, clara, así obtenida se mezcló, para la disociación de los grupos citraconílicos adicionalmente con ácido clorhídrico concentrado hasta alcanzar la mezcla de reacción un pH de 3,5. Después de reposar durante 24 horas a 20°C se filtró la solución, para separar los componentes de bajo peso molecular, con ácido acético al 50% a través de gel de polidextrano reticulado (Sephadex <sup>(R)</sup> G 10). Los productos de reacción polímeros se separaron por cromatografía en gel de polidextrano reticulado (Sephadex <sup>(R)</sup> G 50). Al secar por congelación la fracción monómera se obtuvieron 178 mg de derivado azóico marrón (71%).

Movilidad electroforética relativa: -0,87 (celogel)

o bien -0,95 (electroforesis de disco);

$E_{328}^{1\text{ cm}} = 14,3$  (a 6,5 g/l, tampón tris 0,1 m, pH 7,5);

Análisis del aminoácido: véase tabla 1.

EJEMPLO 6.-

De 250 mg (78  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 1 se obtuvo como indicado en el ejemplo 5 el compuesto citraconílico, éste se transformó con la sal diazónica obtenida de 28 mg de 3-amino-1,2,4-triazol (330  $\mu$  moles) y 25 mg de nitrito sódico ( 365  $\mu$  moles) en la forma usual, a un pH de 8,5 y a 4°C en el correspondiente derivado azóico. Después de separar los restos citraconílicos y separar las sustancias acompañantes de bajo peso molecular y las sales por filtración a través de gel de polidextrano reticulado (Sephadex <sup>(R)</sup> G 10) se obtuvieron con ácido acético al 50% 198 mg (79%) de compuesto azóico marrón.

Movilidad electroforética relativa: 0,0 y - 0,78 (celogel) o bien -0,92, -0,82, -0,68 y -0,52 (electrofóresis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 23,5 \text{ (a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1 \text{ m, pg } 7,5);$$

Análisis de aminoácido: véase tabla 1.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

5 1.- Procedimiento para la obtención de derivados del inhibidor de tripsina pancreatica básica, donde una parte o todos los grupos carboxilo del BPTI natural o de un derivado de desamido, obtenido por desamidización de éste, están modifi-  
cados, caracterizado porque BPTI o derivados de BPTI se hacen reaccionar con carbodiimidias en medio acuoso, o que contenga agua, a valores pH entre 3 y 11, los productos de reacción for-  
mados, en caso dado, se aíslan y/o en caso dado a continuación, se desaminiza por reacción con agentes suministradores de iones  
10 nitrosilo o con compuestos de diazonium no copulantes, y/o se diazota en caso dado por reacción con compuestos de diazonium capaces de copulación a valores pH entre 1 y 12, y los productos de reacción que en cada caso se forman, se aíslan según mé-  
15 todos conocidos.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracte-  
terizado porque la reacción con la carbodiimida se efectua en solución acuosa a un pH entre 4,5 y 7,5.

20 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracte-  
terizado porque la reacción con la carbodiimida se efectua a una temperatura entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $+50^{\circ}\text{C}$ .

4.- Procedimiento para la obtención de derivados del inhibidor de tripsina pancreatica básica, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

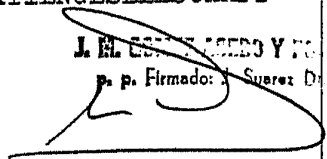
Esta Memoria consta de 30 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 30 ABR. 1979

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

~~L. EL...~~

p. p. Firmado: Suarez D.

A large, stylized handwritten signature in black ink, written over the printed text of the document.