

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO	⑩ A1
	474.559	
	⑫ FECHA DE PRESENTACION	
	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.

③① PRIORIDADES: ③② NUMERO	③③ FECHA	③④ PAIS
P 27 48 295.7	27 de Octubre de 1.977	R.F. ALEMANA

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

⑤④ TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE DERIVADOS DEL INHIBIDOR DE TRIPSINA PANCREATICA BASICA.

⑦① SOLICITANTE (S)
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT,

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana:

⑦② INVENTOR (ES)
Dr.Eugen Schnabel, Dr.Gerd Reinhardt, Prof.Dr.Horst Dieter Schlumberger, Dr.Hans-Georg Opitz, Dr.Ernst Truscheit y Prof.Dr. Harald Tschesche.

⑦③ TITULAR (ES)

⑦④ REPRESENTANTE
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

La presente invención se refiere a nuevos derivados del inhibidor de calicreina-tripsina y, especialmente al inhibidor de la calicreina-tripsina de órganos de reses (mencionado a continuación BPTI = basic pancreatic trypsin inhibitor / Kunitz).

5

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 (quinogénasas), plasmina, quimotripsina y tripsina (E. Werle en W. Brendel, G.L. Haberland: Neue Aspekte der Trasulol-Therapie, 5, 9, F. K. Chatauer-Verlag Stuttgart-New York 1972; H. Fritz, H. Tschesche, I.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.

10

15

Asímismo es conocido que los grupos carboxilo libres de las proteínas se pueden condensar en presencia de carbodiimidias hidrosolubles con nucleófilos, especialmente con aminas, bajo desarrollo de enlaces carbón-amida [D.G. Hoare y D. E. Koshland, J. Biol. Chem. 242, 2447 (1967)].

20

Asímismo es conocido que de esta manera también se pueden sustituir en el BPTI, según las condiciones de reacción, 3-4 de los grupos 5-carboxilo con éster de glicinmetilo. [J. Chauvet y R. Acher, FEBS Letters 2, 17 (1968)]. Otras reacciones de BPTI y aminas en presencia de carbodiimida no han sido descritas en la literatura.

25

30

Se ha descubierto ahora que se obtienen nuevos derivados del BPTI en el cual solo una parte de los grupos carboxilo está modificado si el BPTI de origen natural o los derivados del BPTI que contienen grupos carboxilo libres se hacen reaccionar a valores pH entre 3 y 11 en solución acuosa que, en caso dado también contiene disolventes orgánicos y/o sales y/o agentes de desnaturalización, con compuestos amino nucleófilos, con excepción del éster de glicinetilo en presencia de carbodiimidas, los productos de reacción obtenidos, en caso dado, se aislan como tales y los productos de reacción, en caso dado, se desaminizan y/o, en caso dado se transforman en los correspondientes derivados azóicos.

Sorprendentemente poseen los nuevos derivados del BPTI obtenibles según la presente invención un espectro de inhibición más amplio y más valioso que el BPTI conocido por la literatura.

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, calicreina 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 sólo 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

30 /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/, 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).

La reacción del BPTI y de los derivados del BPTI con carbodiimidas y compuestos amino nucleófilos se realiza preferentemente a valores pH entre 3 y 11, especialmente entre un pH de 4 y un pH de 8, en solución acuosa, que, sin embargo, también puede contener disolventes orgánicos, y/o sal, y/o agentes de desnaturalización. Como disolventes orgánicos en caso dado agregables sean mencionados preferentemente: dimetilformamida, sulfóxido dimetílico, triamida del ácido hexametilfosfórico, piridina, dimetilacetamida. Como sales sean mencionadas: LiCl, NaCl y, como agente de desnaturalización: hidrocloruro de guanidina, úrea.

Como compuestos amino nucleófilos entran preferentemente en consideración los siguientes compuestos o clases de compuestos: amoníaco, hidrazina, hidrazina sustituida, ami-

nas primarias y secundarias, alifáticas o cicloalifáticas, que en caso dado llevan todas adicionalmente grupos funcionales, tales como por ejemplo hidróxi, alcoxi, amino, alquil- y dialquil-amino, mercapto, alquilmercapto, guanidino, amidino, 5 carboxilo, carboalcoxi, carbamido, ciano, sulfo así como también restos aromáticos o heterocíclicos con grupos funcionales adicionales, y otros.

Compuestos amino nucleófilos especialmente adecuados son los aminoazúcares, aminoalcoholes, ácidos minosulfónicos, los derivados de aminoácidos, tales como por ejemplo 10 los ésteres, amidas, nitrilos de aminoácidos, así como los oligopéptidos dotados de los grupos protectores necesarios. Entran especialmente en consideración aquellos oligopépticos que contienen restos de ácido asparagínico y/o ácido glutamínico en el enlace péptido y/o isopéptido. 15

Los mencionados derivados de aminoácido y de péptidos se pueden obtener de los aminoácidos ópticamente activos o de sus racematos. Si se emplean los ésteres de butilo terciario de los aminoácidos mencionados, o los péptidos, se 20 pueden liberar los grupos carboxilo después de la reacción con el BPTI o los derivados del BPTI que entran en consideración por tratamiento con ácidos, según métodos en sí conocidos.

Los compuestos amino utilizables preferentemente para la obtención de los nuevos derivados de BPTI según la 25 presente invención tienen la siguiente estructura:

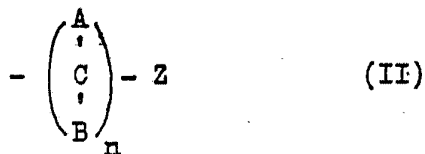


En esta fórmula significan:

X hidrógeno o un resto alquilo sin ramificar o ramificado o un

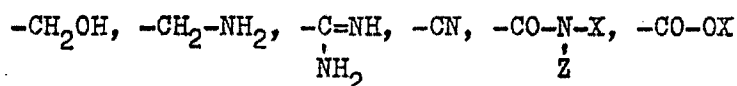
resto cicloalquilo o un resto arilo. Estos restos pueden llevar en caso dado sustituyentes adicionales. Y los mismos grupos como en X. Cuando X es hidrógeno Y está especialmente por un resto de fórmula general

5



10

donde  $n$  tiene los valores 1 hasta 5 y A significa hidrógeno o un resto alquilo, mientras B significa asimismo hidrógeno o un resto alquilo que, en caso dado, está sustituido por un grupo hidroxilo, amino, mercapto ó guanidino, ó un heterociclo o también por un grupo del significado Z, donde Z así y en la fórmula (II) puede representar los siguientes grupos funcionales:



15

donde X y Z también tienen los significados como en las fórmulas (I) y (II), pero Z no debe ser  $-CO-OC_2H_5$ , siempre que en (II) A sea hidrógeno y B sea hidrógeno y  $n$  sea 1. En los derivados asimétricamente sustituidos se pueden emplear los compuestos ópticamente activos o también los compuestos racémicos.

20

Además, Y puede ser también un grupo de fórmula  $-(CH_2)_m-SO_3H$  donde  $m$  es 1 hasta 4.

25

Además, Y puede formar junto con X en la fórmula (I) un sistema de anillo común de 3 hasta 6 miembros que, en caso dado, puede contener ulteriores heteroátomos y/o llevar también sustituyentes del tipo Z.

Además Y puede corresponder a una agrupación de fórmula general



donde R y R' tienen el mismo significado como X en la fórmula (I).

5 Como carbodiimidas se pueden emplear en la reacción según la presente invención para la obtención de los compuestos 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:

10 Diciclohexilcarbodiimida,  
 N-ciclohexil-N'-[2-(4-morfolinil)-etil]-carbodiimida-metotolueno-4-sulfonato,  
 Hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida,  
 15 N-terc.-butil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida,  
 Hidrocloruro de N-ciclohexil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida,  
 Hidrocloruro de N-isopropil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida,  
 20 N-ciclohexil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida-metotolueno-4-sulfonato,  
 N,N'-diisopropil-carbodiimida,  
 N,N'-di-para-tolil-carbodiimida.

25 La reacción según la presente invención se efectúa preferentemente a temperaturas entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $+50^{\circ}\text{C}$ , especialmente 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 10 hasta 25 moles del compuesto

amino nucleófilo. Referido al compuesto aminonucleófilo se emplea el carbodiimida utilizado en defecto. Preferentemente, se emplean aproximadamente un 85-95% de la cantidad molar del compuesto amino nucleófilo.

5 Las mezclas resultantes en las reacciones se pueden fraccionar, en caso dado, según procedimientos en sí conocidos, por ejemplo, por electrofóresis, filtración de gel o cromatografía de intercambio de iones.

10 Además, los nuevos derivados del BPTI de la presente invención se obtiene desaminizando a continuación, total o parcialmente, los derivados obtenidos por la reacción del BPTI ó de sus derivados, que contienen grupos carboxilo libres, con carbodiimidas y los compuestos amino nucleófilos. Para ello se hacen reaccionar los derivados con agentes suministradores de iones de nitrosilo, tales como sales, ésteres o anhídridos mixtos del ácido nitroso en solución ácida, en caso dado en presencia de aditivos en sistema heterogéneo u homogéneo.

15 Alternativamente se puede realizar la desaminación ulterior por reacción de los derivados con compuestos de diazonium no copulantes adecuados (por ejemplo por reacción con el producto de reacción de 5-aminotetrazol y compuestos suministradores de iones nitrosilo).

20 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 y compuestos amino nucleófilos, a continuación con compuestos diazonium en solución acuosa que, en caso dado, puede contener también disolventes orgánicos, tales como por ejemplo pídridina, quinolina, dimetilformamida, sulfóxido dimetílico o hexametilfósforotriamida, y/o

25

30

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

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 cada caso, pueden contener los aditivos arriba indicados, con soluciones de 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 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.

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 componentes de copulación.

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 dado, antes de la elaboración de la mezcla de reacción, por ejem

5 plo, por adición de fenol a la solución de reacción. El consumo en compuesto de diazonium durante las reacciones de copulación se pueden seguir mediante copulaciones de muestra con 1-(2-aminoetilamino)-naftalina. 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  
15 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 aminobencenoarsínicos, ácidos aminobenzóicos, aminodifeniléter; como aminas polinucleares son especialmente adecuadas la  $\alpha$ - y  $\beta$ -naftilamina, así como sus derivados, por ejemplo, los ácidos aminonaftalinsulfónicos.

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

30 La diazotación de las aminas empleadas en la azocopulación según la presente invención se efectua según procedimientos usuales /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<sup>7</sup> por reacción con 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.

Además, los nuevos derivados del BPTI según la presente invención se obtienen nitrando los productos obtenidos por reacción de compuestos amino nucleófilos y carbodiimi-

das con BPTI o derivados de BPTI bien con tetranitrometano (B. Meloun, J. Fric, F. Sorm; Eur. J. Biochem. 4, 112 (1968)) o según la presente invención con ácido nítrico, o copulando en la forma acabada de describir con compuestos de diazonium, reduciendo después según procedimientos en sí conocidos (M. Sokolowsky, J. F. Riordan, B.L. Vallee; Biochem. Biophys. Res. Comms. 27, (1967)) los grupos nitro o bien los grupos azóicos introducidos a grupos amino, diazotando además los derivados del BPTI, así resultantes, que ahora llevan en los restos tirosina 10 y/o 21 grupos amino adicionales en la posición o con respecto al grupo hidroxilo fenólico, según los procedimientos usuales y, finalmente, copulando con fenoles o aminas aromáticas o compuestos heterocíclicos.

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 mix-

tos 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 hidrocloreuro 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 hidrofilia, por ejemplo, fenol. Durante la elaboración se puede evitar la nitración por alcalinización de la mezcla de reacción;

b) reacción del mismo en solución ácida, neutra, o débilmente alcalina con compuestos diazonium que se obtienen por diazotación de aminas heterocíclicas, especialmente del 3-amino-1,2,4-triazol ó 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 orgánicos, detergentes, hidrocloreuro 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.

5 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  
10 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. BPTI citraconilado, obtenido de BPTI por reacción con an-  
15 hídrido de ácido citracóico y otros.

Los derivados de BPTI de la presente invención son nuevos. Se pueden caracterizar por sus propiedades químicas, fisico-químicas, bioquímicas, así como biológicas y delimitar con respecto a las sustancias conocidas. Se aplicaron los si-  
20 guientes criterios:

1) Composición del aminoácido

La composición del aminoácido se determinó según S. Moore, D. H. Spackman, W. H. Stein, Anal. Chem. 30, 1195 (1958). La tabla 1 refleja los contenidos de aminoácidos ca-  
25 racterísticos 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	X(AS) <sup>3)</sup>
5	BPTI <sup>4)</sup>	-	6,09	6,00	3,89	4,08	6,01	
10	2	-	5,95	6,00	3,91	4,02	5,98	
	46	2	5,95	5,94	3,97	0,25	4,82	
	48	2	6,00	6,60	3,67	2,17	5,19	
	50	2	5,85	6,10	1,90	3,90	5,66	
	65	2	5,40	6,13	2,86	3,83	5,74	
	6	-	5,74	6,00	3,52	4,00	6,00	7,49 (Glu)
15	57	6	6,00	6,63	2,44	2,49	5,26	6,86 (Glu)
	15	-	6,06	6,00	3,74	4,14	6,16	6,36 (Phe)
	54	15	6,00	5,62	1,85	2,05	5,10	5,85 (Phe)
	18	-	6,36	5,40	3,69	3,84	5,75	1,82 (Ser)
	68	18	5,88	6,01	1,51	3,67	5,62	1,84 (Ser)
	27	-	5,92	6,00	3,73	4,05	8,26	
20	58	27	5,32	6,05	3,01	3,71	8,12	
	29	-	6,60	6,15	3,43	3,92	6,06	3,93 (His)
	56	29	6,00	6,00	2,44	3,20	5,07	1,04 (His)
	30	-	6,22	5,73	3,69	3,77	5,03	3,84 (Thr); 5,75 (Pro)
	67	30	6,30	5,70	1,72	3,58	5,40	4,00 (Thr); 5,11 (Pro)
	38	-	6,10	5,76	3,92	3,95	5,65	5,84 (Glu)
	72	38	6,00	6,00	1,91	4,00	5,68	5,86 (Glu)

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) valores para los aminoácidos introducidos por la modificación de carboxilo; entre paréntesis se indica el correspondiente

diente aminoácido.

4) 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.

5 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 [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)]. 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 0,8 mA/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  $\epsilon$ -aminocaprílico, 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 colotante 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%.

5 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 proyecto de traslación del BPTI. El signo indica el sentido de traslación. El signo negativo significa por lo tanto movilidad catódica.

10 3) Espectros de absorción.-

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

15 4) Espectros de inhibición de proteasas.-

a) Inhibición de elastasa

$\alpha$ -Inhibición de elastasa del páncreas

20 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 e 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 (veá-

25  
30

se 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-alanin-p-nitroanilida se prepararon 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 indicadas 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 410nm. 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 valores 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 329nm.

2 mg de  $\alpha$ -quimotripsina cristalizada se disolvieron en 5 cc de ácido clorhídrico 0,001-n que era de 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 (veáse 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:

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

5 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 ( $\hat{=}$  100%) producida por la misma cantidad de BPTI.

10 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).

20 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.

β -Inhibición de la quininogenasa del páncreas

5 La enzima de ensayo se obtuvo según C. Kutzbach y G. Schmidt-Kastner [Z. Physiol. Chem. 353, 1099 (1972)]<sup>7</sup>; 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  
10 mencionados en la tabla 2 para algunos derivados de BPTI se calcularon como indicado para la inhibición de la quimotripsina.

e) Inhibición de plasmina.

15 La actividad enzimática 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)]<sup>7</sup> de plasma humano.

20 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)-aminometano, 0,05 M de NaCl, ajustado a un pH de 7,2 con HCl).  
25 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  
30 en cada caso 0,45 cc de una solución al 2% de azocaseína

(en tampón, veáse 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 de 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, Universtitaire 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

Deri- vados de BPTI se- gún el ejemplo	Quimo- tripsi- sina	Catep- sina G	Elasta- tasa (pán- creas)	Enzima elasta- sa (gra- nuloci- to)	Cali- creina (pán- creas)	Cali- crei- na (plas- ma)	Plas- mina	Trip- sina
BPTI	100	100	0	0	100	100	100	100
2	105	151	17	17	79	40	15	68
6	97	191	0	20	58	77	38	76
15	135	135	0	17	66	62	25	77
10	18	109	13	0	22	86	72	75
27	88	83	0	13	74	62	19	88
29	92	65	0	13	64	60	45	92
30	79	143	0	32	80	34	85	74
31	124	65	0	15	86	103	85	100
33	148	48	0	12	85	94	28	37
38	77	83	0	15	17	84	33	85
15	42	113	95	0	28	15	47	42
46	121	31	97	64	15	4	0	27
47	106	44	95	66	14	9	5	47
48	111	104	83	18	53	58	49	42
50	123	226	2	19	15	66	24	38
54	116	40	67	15	11	54	5	15
20	56	104	78	14	0	8	104	25
57	130	113	71	9	35	61	15	35
62	147	80	0	0	7	72	29	28
65	59	195	0	17	8	23	33	51
67	78	160	26	26	8	25	24	26
68	57	208	15	26	12	36	29	75
72	74	217	25	49	41	61	81	68
25	75	45	0	0	28	90	66	55
77	97	58	10	39	22	28	15	19
78	97	115	0	36	43	45	32	30
79	156	99	21	26	35	59	19	21

30 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%.

5 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 inhibidor de la inflamación en la rata.

a) Reacción de inflamación inducida por caolina.

10 La reacción de inflamación se indujo por inyección intraplantar a 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  
15 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 hinchazón de la pata infectada, que es una medida para la gravedad de la reacción de inflamación, se sitió temporalmente con el antiflogímetro según Kemper /F. Kemper y  
20 G. Ameln, Z. ges. exp. Med. 131, 407-411 (1959)7.

25 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.

30 La comparación de la acción de los derivados de BPTI según la presente invención demuestran que en su efecto

inhibidor de la inflamación son superiores al BPTI.

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 0,5-1,0 cc 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 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 nuevos derivados de BPTI según la presente invención son superiores al BPTI como medicamentos. De especial ventaja son sus efectos inhibitorios sobre las elastasas. De especial ventaja son sus efectos inhibidores sobre las elastasas del páncreas y los granulocitos, que habren nuevas posibili-

dades 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 (1962)], 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. Hesperhorn 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. Kono, 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 se logra el efecto como con el BPTI en una dosificación considerablemente más reducida, sino que la reacción de inhibición 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. Desórdenes 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.

De 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, intraarticular, intratumoral.
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:

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.

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<sup>(R)</sup> G 10= Dextrano transversalmente reticulado con un límite de extrusión de peso molecular de 700.

Sephadex<sup>(R)</sup> G 50= Dextrano transversalmente reticulado con un límite de extrusión de peso molecular de 30.000.

SP-Sephadex<sup>(R)</sup> = Dextrano reticulado conteniendo grupos sulfopropilo.

Síntesis de los compuestos amino nucleófilos empleados para la modificación con carboxilo del BPTI y de los derivados del BPTI.

A<sub>1</sub>) Hidrobromuro de amida del ácido trans-4-aminometil-ciclohexan-1-carboxílico

a) Ácido trans-4-carbobenzoxiaminometil-ciclohexan-1-carboxílico

La solución de 31,4 g de ácido trans-4-aminometil-ciclohexan-1-carboxílico (0,2 moles) en 200 cc de lejía sódica 1-n se mezcla con una solución de 42,5 g de oxiclóruo carbobenzóico (0,25 moles) en 100 cc de acetona a 40°C en 8 porciones. El pH de la solución de reacción se mantiene durante la reacción en 9,6 mediante lejía sódica 4-n. Se separa así un precipitado. Después de 4 horas se extrae la suspensión dos veces, cada una con 100 cc de éter y mediante adición de ácido clorhídrico 6-n se ajusta a un pH de 1,0. Se extrae entonces con un total de 400 cc de acetato etílico en 3 porciones y los extractos se concentran, después de lavar neutro, en vacío.

El residuo se recristaliza en acetonitrilo. Se obtienen 35 g (48%) de cristales incoloros del p.f. 116-118°C.

Calculado para  $C_{16}H_{21}NO_4$  (291,3) C 66,0 H 7,3 N 4,8

Hallado 65,9 7,4 5,0

5 b) Amida de ácido trans-4-carbobenzoxiametil-ciclohexan-1-carboxílico

27,1 g (0,1 mol) de ácido trans-4-carbobenzoxiametil-ciclohexan-1-carboxílico se disuelven en 200 cc de tetrahidrofurano absoluto. Después de enfriar la solución a -10°C se mezcla esta bajo exclusión de humedad con 9,5 cc (0,1 moles) de cloroforniato de etilo y a -5°C se gotean entonces 11,2 cc de N-metilmorfolina (0,1 mol). 10 minutos después de haber terminado el goteado se mezcla la mezcla de reacción con 50 cc de solución metanólica 10-n de amoniaco y la solución de reacción se agita durante 30 minutos a 0°C y durante otras dos horas a 22°C. Después se separa el hidrocloreuro de la N-metilmorfolina precipitado por filtración y el filtrado se concentra en vacío. El residuo funde, después de recristalizar en azetonitrilo a 186°C.

20 Calculado para  $C_{16}H_{22}N_2O_3$  (290,4) C 66,2 H 7,6 N 9,7

Hallado 65,7 7,8 9,7

c) Hidrobromuro de amida del ácido trans-4-aminometilciclohexan-1-carboxílico

25 De 5,8 g del compuesto carbobenzóxi descrito bajo A<sub>1</sub>b se obtienen como descrito para el nitrilo bajo A<sub>2</sub>b, por tratamiento con 15 cc de una solución 4-n de ácido bromhídrico en ácido acético glacial, 4,5 g (95%) del amida-hidrobromuro con un p.f. de 245°C. R<sub>F</sub> SBA 0,43

Calculado para  $C_8H_{16}N_2O.HBr$  (237,2) C 40,5 H 7,2 N 11,8 Br 33,7

30 Hallado 4,03 6,9 11,5 35,0

A<sub>2</sub>) Hidrobromuro de trans-4-aminometil-1-ciano-ciclohexano

a) Trans-4-benzoxiaminometil-1-ciano-ciclohexano

5 29 g de la amida obtenida según A<sub>1</sub>b (0,1 mol)  
 se disuelven en 80 cc de piridina absoluta y la solución se  
 mezcla a 50°C con 16 cc de cloruro de ácido bencenosulfónico.  
 La mezcla de reacción se calienta durante 30 minutos a 55°C  
 y después de enfriar a 20°C se le agregan a la mezcla 200 g  
 10 de hielo y ácido clorhídrico concentrado hasta alcanzar un  
 pH de 1,5. La sustancia precipitada se aísla por filtración y  
 el precipitado se lava con agua de hielo hasta que la demost-  
 ración de cloruro en el filtrado sea negativa. Después de socar  
 y recristalizar la torta de filtración en acetato de etilo-  
 éter de petróleo y finalmente en acetato de etilo se obtienen  
 15 20,1 g (72%) de cristales incoloros del p.f. 116-117°C.

Calculado para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (272,3) C 70,6 H 7,4 N 10,3

Hallado 70,3 7,5 9,9

b) Hidrobromuro de trans-4-aminometil-1-ciano-ciclohexano

20 A una solución obtenida bajo ligero calentamiento  
 de 5,4 g (20m-moles) del derivado de carbobenzoxi obtenido se-  
 gún A<sub>2</sub>a) en 10 cc de ácido acético glacial se agregan bajo  
 exclusión de humedad 15 cc de una solución 4-n de ácido brom-  
 hídrico en ácido acético glacial. Después de reposar durante  
 1 hora a 25°C se completa la precipitación del hidrobromuro  
 25 mediante adición de 100 cc de acetato de etilo absoluto y el  
 precipitado se aísla por separación por filtración. Después  
 de disolver y precipitar de 60 cc de cloroformo-acetonitrilo  
 (1:1) y éter absoluto se obtienen 3,6 g (62%) de cristales  
 incoloros, que funden a 212-215°C. R<sub>F</sub> SBA 0,57. (SBA: sec.  
 30 butanol: ácido fórmico: agua = 85:10:15 (vol)).

Calculado para  $C_8H_{14}N_2 \cdot HBr$  (219,1) C 43,8 H 6,9 N 12,8 Br 36,5

Hallado 42,0 6,9 12,6 37,8

A<sub>3</sub>) Dihidrobromuro de trans-4-aminometil-ciclohexan-1-carboxi-  
amidina.

5 a) Hidrocloruro de trans-4-carbobenzoxiaminometil-ciclohexan-  
1-carboxamidina.

5,4 g de trans-4-carbobenzoxiaminometil-1-ciano-  
ciclohexano (20 m moles) (véase A<sub>2</sub>a)) se disuelven bajo ca-  
lentamiento en una mezcla de 0,8 cc de metanol y 5 cc de to-  
lueno. En la suspensión obtenida después de enfriar a 0°C  
10 se introdujo hidrógeno clorado, hasta la disolución total y  
la mezcla se mantuvo durante 48 horas a -60°C. La solución  
se evapora en vacío hasta sequedad y el residuo en forma de  
jarabe se disuelve en 20 cc de amoníaco metanólico saturado.  
15 Esta solución se concentra después de reposar durante 4 horas  
a 25°C y la solución etanólica del residuo en forma de jarabe  
se gotea en 150 cc de éter absoluto. En el secador solidifica  
el precipitado en forma de jarabe a una espuma sólida incolora.  
Rendimiento 2,65 g (40%).

20 Calculado para  $C_{16}H_{23}N_3O_2 \cdot HCl$  (325,8) C 60,0 H 7,4 N 12,9 Cl 10,9

Hallado 58,4 6,9 12,9 11,4

b) Dihidrobromuro de trans-4-aminometil-ciclohexan-1-carboxa-  
midina

2,6 g del derivado de carbobenzoxi descrito bajo  
25 A<sub>3</sub>a) se hacen reaccionar, como descrito para el nitrilo des-  
crito bajo A<sub>2</sub>b) con 5 cc de una solución 4-n de ácido bromhí-  
drico en ácido acético glacial. Después de reaccionar durante  
1 hora se obtienen por precipitación con éter absoluto 2,5 g  
de una sustancia incolora muy hidrocópica que funde bajo  
30 descomposición a 242°C, (98% de rendimiento).

Calculado para  $C_8H_{17}N_3 \cdot 2HBr$  (317,1) C 30,3 H 6,0 N 13,3 Br 50,4

Hallado 30,4 5,8 12,3 48,8

A<sub>4</sub>)  $\xi$ -terc.-butiloxycarbonil-L-silin-amida

a)  $\alpha$ -carbобензохи- $\xi$ -terc.-butiloxycarbonil-L-silin-amida

17 g (30 m moles) de sal  $\alpha$ -carbобензохи- $\xi$ -terc.-butiloxycarbonil-L-lisin-diciclohexilamónica [E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 674, 218 (1964)] se hacen reaccionar en 130cc de dimetilformamida absoluta, como en la síntesis descrito bajo A<sub>1</sub>b) de amida de ácido trans-4-carbобензохиаминотил-циклоhexan-1-carboxílico, con cloroformiato de etilo al anhídrido mixto y éste se transforma en la amida correspondiente. Rendimiento después de recristalizar en acetonitrilo: 9,4 g (8 %); p.f. 142-143°C;

$[\alpha]_{578}^{20} = + 3,6^\circ$  (c = 1, en dimetilformamida).

b)  $\xi$ -terc.-butiloxycarbonil-L-lisin-amida

9 g (24 m moles) del compuesto de carbобензохи descrito bajo a) se disuelven en 100 cc de etanol. A la solución se le agrega mohl de paladio recién preparado de 0,5 g de cloruro de paladio y se deja perlar, bajo buena mezcla, a través de la suspensión una corriente de hidrógeno. Después de 5 horas se separa el catalizador por filtración. Después de separar el alcohol por destilación en vacío quedan unos cristales incoloros. Estos funden, después de recristalizar en acetonitrilo y en acetato de etilo éter de petróleo a 99-100°C; R<sub>F</sub> SBA 0,42; rendimiento 5 g (86%);

$[\alpha]_{578}^{20} = + 15,4^\circ$  (c = 1, en ácido acético glacial).

Calculado para  $C_{11}H_{23}N_3O_3$  (245,3) C 53,8 H 9,5 N 17,1

Hallado 53,4 9,5 17,2

A<sub>5</sub>) Dihidrocloruro de L-ornitinamida

a)  $N\alpha, N\delta$ -bis-terc.-butiloxycarbonil-L-ornitina

26 g de L-ornitina (0,2 moles) se acilan según procedimientos usuales [E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967)] a un pH de 9,5 con terc.-butiloxicarbonilazida. Mediante reacción de la sustancia inicialmente como jarabe con dicitclohexilamina se obtiene la sal dicitclohexilamónica cristalizada en un rendimiento del 64% = 65,2 g del p.f. 166°C.

Calculado para  $C_{15}H_{25}N_2O_6 \cdot C_{12}H_{23}N$  (513,7) C 63,1 H 10,0 N 8,2  
Hallado 63,1 9,9 8,2

La  $N\alpha$ ,  $N\delta$ -bis-terc.-butiloxicarbonil-L-ornitina cristaliza, después de descomponer la sal dicitclohexilamónica con ácido sulfúrico 2-n al reposar bajo diisopropiléter, y funde a 112-113°C;  $[\alpha]_D^{21} = -5,9^\circ$  (c = 1,1 en ácido acético glacial).

Calculado para  $C_{15}H_{28}N_2O_6$  (332,4) C 54,2 H 8,5 N 8,4  
Hallado 54,2 8,6 8,4

b)  $N\alpha$ ,  $N\delta$ -bis-terc.-butiloxicarbonil-L-ornitinamida

De 26 g (78 m moles) del derivado de ornitina descrito bajo a) se obtienen análogo a A<sub>1</sub>b) 22 g (55%) de la amida que, después de recrystalizar en acetonitrilo funde a 153-154°C.  $[\alpha]_D^{25} = -0,5^\circ$  (c = 1, en ácido acético glacial).

Calculado para  $C_{15}H_{29}N_3O_5$  (331,4) C 54,3 H 8,8 N 12,7  
Hallado 55,0 9,1 12,7

c) Dihidrocloruro de L-ornitinamida

11 g (33 m moles) de la amida descrita bajo b) se disuelven en 20 cc de ácido trifluoracético. Después de reposar durante 30 minutos a 22°C se mezcla la solución con 50cc de una solución etérica 6-n de ácido clorhídrico. El dihidrocloruro precipitado se aísla por filtración. Se obtienen 6,5 g (96%) de cristales incoloros con un p.f. de 196°C (descomposición);

$[\alpha]_{578}^{22} = + 15,3^{\circ}$  (c = 1, en ácido trifluoracético).

Calculado para  $C_5H_{13}N_3O \cdot 2HCl$  (204,1)

	C 29,4	H 7,4	N 20,6	Cl 34,7
Hallado	29,6	7,5	20,4	34,5

5 A<sub>6</sub>) N-metil-L-treoninol

La solución de 27 g de éster de metilo de carboben-  
zoxi-L-treonina (0,1 mol) [G.A. Dekker, S.P. Taylor y J.S.  
Fruton, J. Biol. Chem. 180, 155 (1949)] en 300 cc de tetrahi-  
drofurano absoluto se mezcla bajo agitación y enfriamiento,  
gota a gota, con una solución de 12 g de alanato de litio  
(0,31 moles) en tetrahidrofurano. Después del goteado se re-  
tira el baño de enfriamiento y la solución de reacción se ca-  
lienta durante 1 hora en el refrigerador de reflujo hasta her-  
vir. La mezcla de reacción enfriada se mezcla cuidadosamente  
con 50 cc de agua de hielo y los hidróxidos precipitados se  
separan por succión. El residuo se extrae varias veces con  
metanol. Los filtrados reunidos se concentran y el residuo  
en forma de jarabe se destila fraccionadamente. A un p.eb<sub>0,5</sub>  
102° destilan 8,9 g (75%) de un líquido viscoso incoloro.

20  $[\alpha]_{578}^{22} = - 27,4^{\circ}$  (c = 1, en dimetilformamida).

Calculado para  $C_5H_{13}NO_2$  (119,2) C 50,4 H 11,0 N 11,8

Hallado 49,9 10,7 11,9

A<sub>7</sub>) Ester de di-terc.-butilo de ácido  $\gamma$ -terc.-butil-L-glutamil-  
L-glutamínico.

25 a) éster de di-terc.-butilo de ácido carbobenzoxi- $\gamma$ -terc.-  
butil-L-glutamil-L-glutamínico.

24 g de éster de terc.-butilo de ácido carbobenzoxi-  
L-glutamínico (70 m moles) [R. Schwyzer y H. Kappeler, Helv.  
Chim. Acta 44, 1991 (1961)] y 18,5 g de éster de di-terc.-buti-  
lo del ácido L-glutamínico (70 m moles) [G. W. Anderson y F. M.

Callahan, J. Amer. Chem. Soc 82, 3359 (1966)] se disuelven en 100 cc de tetrahidrofurano absoluto. Después de enfriar la solución a  $-5^{\circ}\text{C}$  se introducen 14,6 g de dicitclohexilcarbodiimida sólida y la mezcla se mantiene durante 2 días a  $+4^{\circ}\text{C}$ . Después se separa por succión la dicitclohexilúrea formada y el filtrado se concentra en vacío. El residuo en forma de jarabe se disuelve en 250 cc de acetato de etilo y la solución se extrae consecutivamente con solución al 10% de ácido cítrico, con solución acuosa al 5% de bicarbonato sódico y finalmente con agua. El acetato de etilo se separa por destilación en vacío. El jarabe que queda cristaliza al reposar bajo poco éter de petróleo. Se obtienen 31 g de cristales incoloros del p.f.  $84-86^{\circ}\text{C}$ ;  $R_F$  CMA 0,83 (CMA: Cloroformo: metanol: ácido acético = 190:10:6 (Vol)).  $[\alpha]_{578}^{24} = -18,2^{\circ}$  (c = 1,05, en dimetilformamida).

Calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_9$  (578,7) C 62,3 H 8,1 N 4,8  
Hallado 62,6 8,3 4,6

b) éster de di-terc.-butilo de ácido  $\gamma$ -terc.-butil-L-glutamil-L-glutámico.

29 g del compuesto de carbobenzoxi descrito bajo A<sub>7</sub>a) (50 m moles) se disuelven en 150 cc de etanol absoluto. A través de esta solución se conduce, después de agregar aproximadamente 1 g de negro de paladio recién preparado, bajo buena mezcla, con un vibromezclador una lenta corriente de hidrógeno. Después de 12 horas se separa el catalizador por filtración y el filtrado se concentra en vacío. Quedan 19,1 g (86%) de un aceite viscoso.

$R_F$  SBA 0,78;  $[\alpha]_{578}^{22} = -17,1^{\circ}$  (c = 1, en dimetilformamida).

Calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_7$  (444,6) C 59,5 H 9,1 N 6,3  
Hallado 59,9 9,3 6,2

A<sub>8</sub>) Ester de di-terc.-butilo de ácido di-( $\gamma$ -terc.-butil-L-glutamil)-glutamínico.

a) Derivado carbobenzoxi

De 13,5 g de éster de  $\gamma$ -terc.-butilo de ácido carbobenzoxi-L-glutamínico (40 m moles) y 15 g de éster de  $\gamma$ -di-terc.-butilo de ácido terc.-butil-L-glutamil-glutamínico (34 m moles) se obtienen análogo a A<sub>7</sub>a por condensación de carbodiimida en 150 cc de dimetilformamida absoluta 20,5 g de cristales incoloros (87%). La sustancia funde a 110°C, el R<sub>F</sub> CMA se encuentra en 0,89.

$$[\alpha]_{578}^{24} = -17,9^{\circ} \quad (c = 1, \text{ en dimetilformamida})$$

Calculado para C <sub>39</sub> H <sub>61</sub> N <sub>3</sub> O <sub>12</sub> (763,9)	C 61,3	H 8,0	N 5,5
Hallado	61,1	8,0	5,5

b) Hidrogenación catalítica

13,5 g del derivado de carbobenzoxi descrito bajo A<sub>8</sub>a se hidrogenan en 200 cc de éter absoluto como indicado para A<sub>7</sub>b. Después de separar el éter por destilación se obtienen 10,1 g (91%) de jarabe incoloro. R<sub>F</sub> SBA 0,70; R<sub>F</sub> SBN 0,92; (SBN: sec.-butanol: amoníaco al 10% = 85: 15 (Vol)).

$$[\alpha]_{578}^{24} = -16,6^{\circ} \quad (c = 1, \text{ en dimetilformamida})$$

Calculado para C <sub>31</sub> H <sub>55</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> (629,8)	C 59,1	H 8,8	N 6,7
Hallado	59,5	8,9	6,5

A<sub>9</sub>) L-asparagil- $\alpha$ ,  $\beta$ -di-(L-glutaminato de di-terc.-butilo

a) Carboxibenzoxi-L-asparagil- $\alpha$ ,  $\beta$ -di-(L-glutaminato de di-terc.-butilo).

7 g de ácido carbobenzoxi-asparagínico (26 m moles) [M. Bergmann y L. Zervas, Ber. dt. Chem. Ges. 65, 1192 (1932)] y 13,6 g de L-glutaminato de di-terc.-butilo (55m moles) [G. W. Anderson y F. M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. 82, 3359 (1960)] se disuelven bajo adición de 7,5 g de N-hidroxibenzo-

zotriazol en 150 cc de dimetilformamida absoluta y la solución se mezcla, después de enfriar a  $-5^{\circ}\text{C}$ , con 11,3 g de dicitclohexilcarbodiimida (55 m moles). La mezcla de reacción se elabora, después de reposar durante 2 días a  $+4^{\circ}\text{C}$ , como descrito bajo A<sub>7a</sub>. Al mezclar la solución etérica del residuo de evaporación oleaginoso con éter de petróleo se obtienen 12,3 g (63%) de una sustancia amorfa incolora. p.f.  $90^{\circ}\text{C}$  R<sub>F</sub>CMA 0,68;  $[\alpha]_{578}^{22} = -15,9^{\circ}$  (c = 1, en dimetilformamida).

Calculado para C<sub>38</sub>H<sub>59</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> (749,9) C 60,9 H 7,9 N 5,6  
 Hallado 60,7 7,8 5,6

b) Hidrogenación catalítica

De 8,5 g del compuesto de carbobenzoxi descrito bajo A<sub>9a</sub> se obtienen, análogo a A<sub>7b</sub>, por hidrogenación catalítica en 250 cc de éter absoluto 6,5 g de sustancia incolora, en forma de jarabe (93%).

R<sub>F</sub> SBA 0,75; R<sub>F</sub> SBN 0,92;

$[\alpha]_{578}^{23} = -23,5^{\circ}$  (c = 1 en dimetilformamida)

Calculado para C<sub>30</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> (615,8) C 58,5 H 8,7 N 6,8  
 Hallado 59,3 8,3 6,7

A<sub>10</sub>) L-asparagil- $\alpha$ ,  $\beta$ -di-(L-serin-terc.-butiléster-terc.-butiléster).

a) Carbobenzoxi-L-asparagil- $\alpha$ ,  $\beta$ -di-(L-serin-terc.-butiléster-terc.-butiléster)

7 g de ácido carbobenzosi-asparagínico y 12 g de L-serin-terc.-butiléster-terc.-butiléster (55 m moles) se condensan análogo a A<sub>9a</sub> con ayuda de dicitclohexilcarbodiimida y N-hidroxibenzotriazol. El derivado de péptido se obtiene después de elaborar según A<sub>9a</sub> en forma de jarabe y cromatográficamente no unitaria. El jarabe se disuelve en aproximadamente 50 cc de éter absoluto y la solución se introduce en una columna con gel

de sílice 60 (2,5 x 12 cm) y ésta se eluye consecutivamente con éter de petróleo, éter de petróleo-éter (1:1) y éter. Después de separar el éter de petróleo por destilación del eluado del éter de petróleo se obtienen 15,3 g de aceite incoloro, altamente viscoso, del  $R_F$  SBA 0,92 cromatográficamente puro (89%)  $[\alpha]_D^{23} = +9,6^\circ$  (c = 1, en dimetilformamida).

Calculado para  $C_{34}H_{55}N_3O_{10}$  (665,8) C 61,3 H 8,3 N 6,3  
Hallado 61,6 8,2 6,4

b) Hidrogenación catalítica

De 10,5 g del compuesto de carbobenzóxi descrito bajo  $A_{10}^a$  se obtiene después de hidrogenar catalíticamente análogo a  $A_8^b$  primeramente una sustancia en forma de jarabe, cromatográficamente no unitaria. Por cromatografía en gel de sílice 60 se aislan análogo a  $A_{10}^a$  con éter de petróleo 5,7 g (68%) de sustancia que cristaliza con éter-éter de petróleo. P.f.  $70^\circ C$   $R_F$  SBA 0,65;  $R_F$  SBN 0,92;  $R_F$  CMA 0,12;  $[\alpha]_D^{23} = +3,9^\circ$  (c = 1, en dimetilformamida).

Calculado para  $C_{26}H_{49}N_3O_8$  (531,7) C 58,7 H 9,3 N 7,9  
Hallado 58,2 9,3 7,8

20 Reacción de BPTI y derivados de BPTI con compuestos amino nucleófilos y carbodiimidas.

EJEMPLO 1.-

A la solución de 1 g de BPTI (154  $\mu$  moles) en 100cc de agua se agregan 2,7 g de cloruro amónico (50 m moles) y después de ajustar a un pH de 4,5 1,95 g de hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (10 m moles). Mediante adición de ácido clorhídrico 1-n se mantiene el pH ajustado con ayuda de un autotitrador. Después de 3 horas se agregan 1,7 g de acetato sódico a la solución y la solución se concentra por ultrafiltración con una membrana de ultrafil-

tración UM 05-Diaflow a un volúman de unos 10 cc. El retentado se desala por filtración a través de Sephadex G 10 y se libera de las partes de bajo peso molecular. Las sustancias acompañantes de mayor peso molecular -75 mg (7,5%) - se separan por cromatografía en Sephadex <sup>(R)</sup> G 50 con solución 0,05-m de acetato amónico. Después de secar dos veces por congelación la fracción monómera se obtienen 720 g de sustancia incolora (72%). Movilidad electroforética relativa: -1,44 (celogel) o bien 1,08 (electrofóresis de disco).

10  $[\alpha]_{578}^{22} = 107,7^{\circ}$  (c = 0,5 en agua).

EJEMPLO 2.-

A una solución de 1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 2,4 g de N-metil-L-treoninol (20 m moles) en 130 cc de agua se agregan a 0°C 1,9 g de hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (10 m moles) y la solución de reacción se mantiene durante 6 horas bajo agitación a 22°C bajo un pH de 4,85. Después se elabora como descrito en el ejemplo 1. Además de 130 mg de partes polímeras (10%) se aislaron 1,1 g de sustancia incolora (85%). Movilidad electroforética relativa: -1,26 (celogel) o bien - 1,14 (electrofóresis de disco).

20  $[\alpha]_{578}^{22} = -109^{\circ}$  (c = 0,5. en agua).

EJEMPLO 3.-

De 1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 1,5 g de neobornilamina (10 m moles) se obtiene según el ejemplo 2, con ayuda de 1,45 g de hidrocioruro de de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida un producto de condensación: Rendimiento: 1120 mg (86%) así como 92 mg de partes polímeras (7%). Movilidad electroforética relativa: -1,2 o bien -1,65 (2 bandas; celogel).

25

EJEMPLO 4.-

1 g de BPTI (154  $\mu$  moles) y 1,47 g de Taurina (10 m moles) se disuelven en 100 cc de agua. A la solución se agregan, después de ajustar a un pH de 4,75, 2,1 g de meto-p-toluenosulfonato de N-ciclohexil-N'-(2-morfolinoetil)-carbodiimida (5 m moles) y la solución de reacción se elabora después de 5 horas como descrito en el ejemplo 2. Por cromatografía en Sephadex G 50 se obtienen 925 mg (92%) de sustancia incolora.

10 Movilidad electroforética relativa: -1,21 (celogel) o bien 1,06 (electroforesis de disco).

$$[\alpha]_{478}^{20} = -73,2^{\circ} \text{ (c = 0,5, en agua).}$$

EJEMPLO 5.-

15 A una solución de 1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 7,15 g de hidrocloreuro de glicinamida (6,5 m moles) [H. E. Johnson y D.G. Crosby, J. Org. Chem. 27, 798 (1962)] en 130 cc de agua se agregan, después de ajustar a un pH de 4,75, 2,5g de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (1,3 m moles) y la mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 6 horas a temperatura ambiente. El preparado se dializa en una manga de diálisis acetilada (L.C. Craig y T.P. King in Methods of Biochemical Analysis Vol. X, S.175; Hrsg.: D. Glick, Interscience publishers New York/London 1962) contra agua y el retentado se liofiliza. Para separar las sales se filtra el liofilizado a través de Sephadex <sup>(R)</sup> G 10 y las partes altamente polimerizadas (55 mg = 4%) se separan por cromatografía en Sephadex G 50 con ácido acético 0,1-m como eluyente. El rendimiento en sustancia incolora asciende a 1050 mg (80%).

30 Movilidad electroforética relativa: -1,48 (celogel) o bien

-1,15 (electrofóresis de disco);

Análisis cuantitativo de aminoácido: 9,6 Gly/mol (BPTI: 6);

$$[\alpha]_{578}^{20} = -100,2^{\circ} \quad (c = 0,5, \text{ en agua}).$$

EJEMPLO 6.-

5                   Según el procedimiento descrito en el ejemplo 5 se obtienen de 1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) u 3,4 g de hidrobromuro de L-glutaminamida (15 m moles) /C.A. Dekker, D. Stone y J.S. Fruton, J. Biol. Chem. 181, 719 (1949)/ con ayuda de 1,92 g de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (10 m moles) 908 mg (70%) de producto de condensación.

Movilidad electroforética relativa: -1,34 (celogel) o bien -1,12 (electrofóresis de disco).

Análisis cuantitativa de aminoácido: 7,5 Gly/mol (BPTI :3);

15                    $[\alpha]_{578}^{22} = -103,1^{\circ} \quad (c = 0,5, \text{ en agua}).$

EJEMPLO 7.-

2,6 g de BPTI (400  $\mu$  moles) y 10,4 g de éster di-terc.-butílico de ácido L-glutamínico (40 m moles) /G. W. Anderson y F.M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. 82, 3359 (1960)/ se disuelven en 200 cc de agua y a un pH de 5,0 se hace reaccionar con 3,85 g de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (20 m moles) como descrito en el ejemplo 5. La solución de reacción se elabora en forma análoga. Después de cromatografiar en Sephadex <sup>(R)</sup> G 50 se obtienen 110 mg (4%) de partes polímeras y 2032 mg (78%) de sustancia monómera.

Movilidad electroforética relativa: -1,45 (celogel) o bien -1,02 (electrofóresis de disco); Análisis de aminoácido: 6,6 Glu/Mol) (BPTI:3);

25                    $[\alpha]_{578}^{20} = -104,9^{\circ} \quad (c = 0,5, \text{ en agua}).$

EJEMPLO 8.-

La solución de 785 mg de derivado de BPTI según el ejemplo 7 en 7 cc de ácido trifluoracético anhidro se mantiene durante una hora a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno. Después se agregan 20 cc de éter absoluto a la solución y el precipitado obtenido se lava, después de separar por succión, con éter, piridina-éter (1:4) y finalmente con acetato de etilo. El residuo se disuelve en agua y la solución se desala por filtración a través de Sephadex <sup>(R)</sup> G 10 con ácido acético 0,1-m como eluyente. Por secado por congelación de los filtrados que contienen la proteína se aíslan 780 mg (~ 100%) de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: -0,96 (celogel) o bien -1,06 (electroforesis de disco); análisis de aminoácido: 6,3 Glu/Mol (BPTI : 3).

EJEMPLO 9.-

1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) se hacen reaccionar como indicado en el ejemplo 7 con éster de di-terc.-butilo de ácido L-glutamínico empleándose en lugar de agua 100 cc de sulfóxido dimetílico al 90% como disolvente. Terminada la reacción se separan la mezcla de disolventes en alto vacío y el residuo se lava varias veces con éter. El producto obtenido se disuelve en 10 cc de ácido trifluoracético absoluto, la solución se concentra a 2 cc y el residuo se filtra, después de disolver en 10 cc de agua, a través de Sephadex G 10 con ácido acético 1-m. Las fracciones que contiene la proteína se cromatografían, después de secar por congelación, en Sephadex G 50 con ácido acético 0,1-m como eluyente. Se aíslan finalmente 850 mg de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: -0,8 (celogel) o bien -1,0

(electroforesis de disco); Análisis de aminoácidos: 4,75 Glu/mol (BPTI : 3).

EJEMPLO 10.-

De 1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 4 g de éster de terc.-butilo de L-fenilalanina (18 m moles) [G. W. Anderson y F.M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. 82 3359 (1960)] se obtienen según el método indicado en el ejemplo 7, con ayuda de 1,92 g (10 m moles) de hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, a un pH de 4,9, un producto de condensación que según cromatografía en Sephadex G 50 contiene 56 mg de partes polímeras (4%) y 1020 mg de sustancia monómera (78%).

Movilidad electroforética relativa: -1,4 (celogel) o bien -1,11 (electroforesis de disco); análisis de aminoácidos: 5,95 Phe/mol (BPTI : 4);

$$[\alpha]_{578}^{22} = -97,0^{\circ} \quad (c = 0,5, \text{ en agua}).$$

EJEMPLO 11.-

La solución de 820 mg del derivado de BPTI obtenidos según el ejemplo 10 (125  $\mu$  moles) en 10 cc de ácido trifluoroacético anhidro se mantiene durante 1 hora bajo atmósfera de nitrógeno. La solución se mezcla entonces con 30 cc de éter absoluto y la sustancia precipitada se aísla por centrifugación. El sedimentado se lava suspendiendo varias veces con éter bajo adición de piridina y finalmente con acetato de etilo y la solución obtenida con ácido acético 0,1-m se cromatografía sobre Sephadex <sup>(R)</sup> G 10. Al secar por congelación los filtrados que contienen la proteína se obtienen 810mg (~ 100%) de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: -1,25 y -1,5 (bandas dobles; celogel) o bien -1,12 (electroforesis de disco); análisis

de aminoácidos: 6,23 Phe/mol (BPTI : 4).

EJEMPLO 12.-

1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 4,35 g de L-fenilalaninamida (22 m moles) [K. Blau y S. G. Waley, Biochem. J. 57, 538 (1954)] se hacen reaccionar como descrito en el ejemplo 8 en 130 cc de agua con 2,4 g de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (12,5 m moles). La mezcla de reacción se elabora en forma correspondiente. Se obtienen, además de 105 mg de partes polímeras (8%), 940 mg de sustancia incolora (72%).

Movilidad electroforética relativa: -1,6 (celogel) o bien 1,05 (electroforesis de disco); análisis de aminoácidos: 6,3 Phe/mol (BPTI : 4);

$$[\alpha]_{578}^{20} = -108,5^{\circ} \quad (c = 0,5, \text{ en agua}).$$

15 EJEMPLO 13.-

De 2,6 g de BPTI (400  $\mu$  moles) y 4,65 g de éster de terc.-butilo de D-fenilalanina (21 m moles) [G. W. Anderson y F. M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc, 82, 3359 (1960)] se prepara con ayuda de 2,9 g de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (15 m moles), como descrito en el ejemplo 5, un producto de condensación. Se obtienen 1,95 g de sustancia incolora (75%).

Movilidad electroforética relativa: -1,36 (celogel) o bien -1,10 (electroforesis de disco); análisis de aminoácidos: 5,93 Phe/mol (BPTI : 4);

$$[\alpha]_{578}^{22} = -104,5^{\circ} \quad (c = 0,5, \text{ en agua}).$$

EJEMPLO 14.-

De 750 mg (115  $\mu$  moles) de derivado de BPTI según el ejemplo 13 se obtienen por disolución en 7 cc de ácido trifluoroacético anhidro y manteniendo durante media hora bajo

nitrógeno según el procedimiento descrito en el ejemplo 14  
633 mg (84%) de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: 1,08 (celogel) o bien  
-1,05 (electroforesis de disco); análisis de aminoácidos:

5 6,36 Phe/mol (BPTI : 4);

$[\alpha]_{578}^{20} = -98,9^{\circ}$  ( c = 0,5, en agua).

EJEMPLO 15.-

10 Por condensación de 1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles)  
y 1,51 g de hidrocloreuro de D-fenilalaninamida (7,5 m moles)  
- obtenido análogo al derivado de L-fenilalanina del ejemplo  
12 - se obtienen con ayuda de 1,44 g de hidrocloreuro de N-  
etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (7,5 m moles) a  
un pH de 5,0, como descrito en el ejemplo 5, 1120 mg de pro-  
ducto de condensación monómero (86%).

15 Movilidad electroforética relativa: -1,45 (celogel) o bien  
- 1,08 (electroforesis de disco); análisis de aminoácidos:  
7,13 Phe/mol (BPTI : 4).

EJEMPLO 16.-

20 1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) se hacen reaccionar  
como descrito en el ejemplo 5 con 2,65 g de terc.-butilcarba-  
zato (20 m moles) [L.A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc. 79, 4427  
(1957)] como compuesto amino nucleófilo y 2,5 g de hidrocloreuro  
de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (12 m moles)  
y la mezcla de reacción se elabora en forma correspondiente.

25 Se obtienen 1110 mg (85%) de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: -1,5 (celogel) o bien  
-1,05 (electroforesis de disco).

EJEMPLO 17.-

30 1 g del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo  
16 se disuelven, como indicado en el ejemplo 8, en ácido tri-

fluoracético y la solución se elabora en forma correspondiente.

Se obtiene en rendimiento cuantitativo una sustancia incolora:

Movilidad electroforética relativa: -1,14 (celogel).

5 EJEMPLO 18.-

1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 1,085 g (5 m moles) de éster de terc.-butilo de L-serin-terc.-butiléter /H.C, Beyer-  
man y J.S. Bontekoe, Proc. Chem. Soc. 1961, 249/ se condensan  
con ayuda de 575 mg (3 m moles) de hidrocioruro de N-etil-  
10 N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida análogo al ejemplo 5.  
Después de separar las mezclas de bajo peso molecular por fil-  
tración a través de Sephadex G 10 con ácido acético 1-m se  
seca por congelación la fracción que contiene la proteína.

15 El liofilizado se disuelve en 7,5 cc de ácido tri-  
fluoracético anhídrido y la solución se mantiene durante 30 mn  
bajo atmósfera de nitrógeno a 22°C. La solución se diluye con  
7,5 cc de agua y se fracciona por cromatografía en Sephadex (R)  
G 50 con ácido acético 0,1-m como eluyente. Rendimiento: 985 mg  
(76%). Movilidad electroforética relativa: -1,62 (celogel)  
20 o bien -1,16 (electrólisis de disco); análisis de aminoácidos:  
1,82 Ser/mol (BPTI : 1).

EJEMPLO 19.-

1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 5,4 g de L-glucosa-  
mina (2,5 m moles), se hacen reaccionar como descrito en el  
25 ejemplo 5 con ayuda de 2,4 g de hidrocioruro de N-etil-N'-  
(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (12,5 m moles) en 100 cc  
de agua a un pH de 5,5 primeramente durante una hora a 4°C y  
durante otras 20 horas a 22°C. La mezcla de reacción se elabo-  
ra como allí descrito. Además de 108 mg de partes polímeras  
30 se aislan por cromatografía en Sephadex (R) G 50 con ácido acé-

tico 0,1 m, como eluyente, 1020 mg (79%) de sustancia incolora.  
 Movilidad electroforética relativa: -1,3 (celogel) o bien  
 - 1,08 (electrofóresis de disco).

EJEMPLO 20.-

5                   1 g de BPTI (154  $\mu$  moles) y 2,4 g de hidrobromuro  
 de trans-4-aminociclohexil-1-carbonamida (10 m moles), se ha-  
 cen reaccionar como descrito en el ejemplo 5 con 1,45 g de  
 hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida  
 (7,5m moles) y la mezcla de reacción se elabora como allí  
 10 descrito. Se obtienen 653 mg (65%) de una sustancia incolora.  
 Movilidad electroforética relativa: -1,33 (celogel) o bien  
 - 1,06 (electrofóresis de disco);

$$[\alpha]_{578}^{20} = - 84,3^{\circ} \text{ (c = 0,5, en agua).}$$

EJEMPLO 21.-

15                   1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 4,4 g de hidrobromuro  
 de trans-4-aminociclo-hexan-1-carbonitrilo (20 m moles) se  
 hacen reaccionar como descrito en el ejemplo 5 con ayuda de  
 1,9 g de hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-car-  
 bodiimida (10 m moles) y la solución de reacción se elabora  
 20 análogo al ejemplo 5. Además de 235 mg de partes polímeras  
 se obtienen 1010 mg de sustancia incolora (78%).  
 Movilidad electroforética relativa: -1,43 (celogel) o bien  
 -1,50 y -1,14 (bandas dobles, electrofóresis de disco);

$$[\alpha]_{578}^{20} = - 93,5^{\circ} \text{ (c = 0,5, en agua).}$$

25 EJEMPLO 22.-

                  De 1,0 g de BPTI (154  $\mu$  moles) y 3,2 g de trans-4-  
 aminociclo-hexan-1-carboxamidina (10 m moles) se obtienen por  
 condensación con 1,9 g de hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetil-  
 aminopropil)-carbodiimida según el ejemplo 5 130 mg de partes  
 30 polímeras y 900 mg de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: - 1,24 (celogel) o bien  
- 1,08 (electrofóresis de disco);

$$\left[ \frac{\alpha}{578} \right]_{578}^{20} = - 105,7^{\circ} \quad (c = 0,5, \text{ en agua}).$$

EJEMPLO 23.-

5                    1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 4,0 g de dihidrocloro-  
ruro de L-cistinamida (12,5 m moles) [I.W. Stapleton y J. M.  
Swan, Austr. J. Chem. 15, 106 (1962)] se mantienen como indi-  
cado en el ejemplo 5, bajo adición de 1,9 g de hidrocloreuro  
de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (10 m moles)  
10 durante 6 horas a un pH de 4,75 - ajustado con HCl -. Después  
de la elaboración usual se obtienen, además de 127 mg de par-  
tes polímeras (10%) 1180 mg de sustancia incolora (91%).  
Movilidad electroforética relativa: -1,5 (celogel) o bien  
- 1,11 (electrofóresis de disco);

15  $\left[ \frac{\alpha}{578} \right]_{578}^{20} = - 112,4^{\circ} \quad (c = 0,4. \text{ en agua}).$

EJEMPLO 24.-

                  1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 3,0 g de  $\epsilon$ -terc.-  
butiloxicarbonil-L-lisinamida (12,5 m moles) se hacen reac-  
cionar según el ejemplo 19 con 1,9 g de hidrocloreuro de N-  
20 etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida a un pH de 4,75  
y la solución de reacción se elabora en forma correspondiente.  
Además de 117 mg de partes polímeras (9%) se obtienen de la  
fracción en monómeros 1105 mg (81%) de sustancia incolora.  
Movilidad electroforética relativa: - 1,46 (celogel) o bien  
25 - 1,11 (electrofóresis de disco); análisis de aminoácidos:  
7,34 Lys/mol (BPTI : 4).

EJEMPLO 25.-

                  550 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejem-  
plo 24 se mezclan bajo atmósfera de N<sub>2</sub> con 5 cc de ácido tri-  
30 fluoracético absoluto. La solución de reacción se mezcla des-

pués de reposar durante 2 horas a temperatura ambiente con 50 cc de éter absoluto. El precipitado obtenido se separa por centrifugación y se disuelve en 10 cc de ácido acético 0,1-m. La solución se desala por filtración a través de Sephadex G 10 con ácido acético 0,1-m. Después de cromatografiar en Sephadex G 50 se obtienen 473 mg de sustancia incolora. Movilidad electroforética relativa: - 1,38 (celogel) o bien - 1,08 (electrofóresis de disco);

Análisis de aminoácidos: 6,24 Lys/mol (BPTI : 4).

$$[\alpha]_{578}^{21} = - 107,5^{\circ} \quad (c = 0,5. \text{ en agua}).$$

EJEMPLO 26.-

1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 5,4 g de dihidrocloruro de L-lisinamida (25  $\mu$  moles) [S. G. Waley y J. Watson, Biochem. J. 57, 529 (1954)] se hacen reaccionar como descrito en el ejemplo 5 mediante hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidaa, y la solución de reacción se elabora en forma correspondiente. Además de 248 mg de material polímero (19%) se obtienen 1250 mg de sustancia monómera.

Movilidad electroforética relativa: - 1,9 o bien - 1,75 (bandas dobles, celogel);

Análisis de aminoácidos: 6,3 Lys/mol (BPTI: 4).

EJEMPLO 27.-

De 1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 5,0 g de dihidrocloruro de L-argininamida (20 m moles) [L. Zervas, T. T. Otani, M. Winitz y J.P. Greenstein, J. Amer. Chem. Soc. 81, 2878 (1959)] se obtienen según el ejemplo 19 con ayuda de 1,92 g de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (10 m moles) además de 135 mg de partes polímeras 1140mg de sustancia incolora (87%).

Movilidad electroforética relativa: - 1,65 (celogel) o bien  
- 1,08 (electroforesis de disco);

Análisis de aminoácidos: 8,3 Arg/mol (BPTI: 6);

$$\left[ \frac{\alpha}{\gamma} \right]_{578}^{21} = - 107^{\circ} \quad (c = 0,4 \text{ en agua}).$$

5

EJEMPLO 28.-

de 1,0 g de BPTI (154  $\mu$  moles) y 4,0 g de dihidrocloruro de L-ornitina (20 m moles) se obtienen análogo al ejemplo 5 con 1,9 g (10 m moles) de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida a un pH de 4,75 760 mg (76%) de producto de condensación monómero incoloro.

10

Movilidad electroforética relativa: - 1,57 (celogel) o bien  
- 1,16 (electroforesis de disco);

Análisis de aminoácidos: 2,18 Orn/mol;

$$\left[ \frac{\alpha}{\gamma} \right]_{578}^{22} = - 101,5^{\circ} \quad (c = 0,5, \text{ en agua}).$$

15

EJEMPLO 29.-

1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 2,27 g de dihidrocloruro de L-histidina (10 m moles) [E.L. Smith y D. H. Spackman, J. Biol. Chem. 212, 271 (1955)] se hacen reaccionar según el procedimiento indicado en el ejemplo 5, empleando 0,96 g de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida a un pH de 4,75 y 4°C. Después de la elaboración usual se obtienen 80 mg de partes polímeras (6%) y 1030mg (79%) de sustancia monómera.

20

Movilidad electroforética relativa: - 1,72 (celogel) o bien  
- 1,11 (electroforesis de disco);

25

Análisis de aminoácidos: 3,95 His/mol;

$$\left[ \frac{\alpha}{\gamma} \right]_{578}^{21} = - 104,3^{\circ} \quad (c = 0,5, \text{ en agua}).$$

EJEMPLO 30.-

De 1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) y 506 mg de hidrocloreuro del éster metílico de L-treonil-L-prolina (2,5 m moles)

30

se obtienen con ayuda de 385 mg de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (2m moles) a un pH de 4,8, análogo al ejemplo 19, 1035 mg de sustancia monómera incolora, (80%).

5 Movilidad electroforética relativa: - 1,26 (celogel) o bien - 1,08 (electrofóresis de disco);

Análisis de aminoácidos: 3,84 Thr/mol, 6,75 Pro/mol (BPTI:3 o bien 4).

EJEMPLO 31.-

10                   Bajo agitación se reúne la solución de 650 mg de BPTI (100  $\mu$  moles) en 50 cc de agua con la solución de 1060mg (2 m moles) de L- $\alpha$ ,  $\beta$ -asparagil-di-(L-serin-terc.-butiléter-terc.-butiléster) en 50 cc de dimetilformamida absoluta y a la mezcla se le agregan finalmente 385 mg (2 m moles) de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. Con ayuda de ácido clorhídrico 0,1-n se mantiene el pH de la mezcla de reacción constante en 4,85. Después de 24 horas se separa el disolvente por destilación en vacío y el residuo se agita durante una hora bajo atmósfera de nitrógeno con 10cc

15

20 de ácido trifluoracético anhidro. Después de separar el ácido trifluoracético por destilación se disuelve el residuo en 5cc de ácido acético al 50% y la solución se desala por filtración a través de Sephadex G 10 con ácido acético 0,1-m como eluyente. Se obtienen 595 mg (92%) de sustancia incolora.

25 Movilidad electroforética relativa: - 1,1 u.--1,35 (celogel) o bien - 1,47 u. =1,34 (electrofóresis de disco);

Análisis de aminoácidos: 5,78 Asp/mol y 4,35 Ser/mol (BPTI: 5 o bien 1).

EJEMPLO 32.-

30                   650 mg de BPTI (100  $\mu$  moles) y 1,23 g de éster de

5 tetra-terc.-butilo de ácido tri-L-glutamínico (2 m moles) se  
 hacen reaccionar con ayuda de 385 mg de hidrocloreuro de N-etil-  
 N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (2 m moles) en una mez-  
 10 cla de 50 cc de dimetilformamida y 65 cc de agua según el mé-  
 todo indicado en el ejemplo 5. El disolvente se separa por  
 destilación en vacío y el residuo se agita durante una hora  
 a 20°C con 10 cc de ácido trifluoracético bajo atmósfera de  
 nitrógeno. Después de concentrar se cromatografía el residuo  
 con ácido acético al 50% como eluyente a través de Sephadex<sup>(R)</sup>  
 15 G 10. Se obtienen 643 mg (99%) de sustancia monómera incolora.  
 Movilidad electroforética relativa: - 0,05 (celogel) o bien  
 - 0,82 (electroforesis de disco);  
 Análisis de aminoácidos: 6,44 Glu/mol (BPTI : 3).

EJEMPLO 23.-

15 Análogo al ejemplo 32 se condensan 1,3 g de BPTI  
 (200  $\mu$  moles) con 3,08 g de éster di-terc.-butílico de ácido  
 $\alpha$ ,  $\beta$ -asparagil-bis- $\alpha$ ,  $\gamma$ -glutamínico (5 m moles) en pre-  
 20 sencia de 670 mg de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilamino-  
 propil)-carbodiimida (3,5 m moles) en una mezcla de 100 cc de  
 dimetilformamida y 50 cc de agua. Después de disociar los gru-  
 25 pos protectores terc.-butilo análogo al ejemplo 32 se obtienen  
 1251 mg de sustancia incolora (96%).  
 Movilidad electroforética relativa: - 0,27 u. 0,05 (celogel)  
 o bien -0,43, - 0,27 y - 0,18 (electroforesis de disco);  
 Análisis de aminoácidos: 5,80 Asp/mol y 5,05 Glu/mol (BPTI:  
 5 o bien 3).

EJEMPLO 34.-

30 1,033 g de derivado de desamino-BPTI (160  $\mu$  moles)  
 disueltos en 100 cc de agua, obtenidos según el ejemplo 34 B,  
 se hacen reaccionar después de una diálisis exhaustiva contra

ácido clorhídrico 0,1-m con 1,085 g (5 m moles) de L-serin-  
terc.-butiléter-terc.-butiléster (H.C. Beyerman y J.S. Bonte-  
koe, Proc. Chem. Soc 1961, 249) a un pH de 5,0 bajo control  
del pH y empleando 770 mg de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-di-  
5 metilaminopropil)-carbodiimida (4 m moles), como descrito en  
el ejemplo 19, primeramente durante 1 hora a 0°C y durante  
otras 20 horas a 22°C. La solución de reacción se desala por  
cromatografía a través de Sephadex <sup>(R)</sup> G 10 con ácido acético  
0,1-m como eluyente. Después de secar por congelación el elua-  
10 do que contiene la proteína se obtienen 890 mg (84%) de sus-  
tancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: - 1,76 (celogel) o bien  
- 1,08 (electroforesis de disco).

720 mg de esta sustancia se tratan como descrito  
15 en el ejemplo 18 con ácido trifluoroacético anhidro para diso-  
ciar los grupos terc.-butilo y el producto de reacción se ela-  
bora análogo al ejemplo 18. Se obtienen 527 mg (75%) de sus-  
tancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: - 0,82 (celogel) o bien  
20 -0,69, - 0,62 y - 0,52 (electroforesis de disco);

Análisis de aminoácidos: 2,38 Ser/mol (BPTI:1).

#### EJEMPLO 34 A.-

500 mg de BPTI (77  $\mu$  moles) se disuelven en 200 cc  
de ácido acético 0,25-m enfriados con hielo, libres de oxí-  
25 geno. Conduciendo nitrógeno a través y bajo buena agitación  
se gotean a 0-4°C en el transcurso de 30 minutos 50 cc de  
solución 2-m de nitrito sódico en la solución del inhibidor  
y la mezcla de reacción se mantiene finalmente durante 24 ho-  
ras bajo atmósfera de nitrógeno a +4°C. Sube así el pH de la  
30 solución de 3,7 a 4,1.

La mezcla de reacción se concentra entonces por ultrafiltración en una célula de ultrafiltración (Amicon) con ayuda de una membrana Diaflow-UM 05, se diluye con agua y nuevamente se concentra. Este proceso se repite varias veces eliminándose finalmente una parte del producto de reacción. El retentado se mezcla con solución de hidróxido amónico 0,1-m hasta amplia disolución del precipitado. El pH de la solución se ajusta con ácido acético 0,1-m a 6,8 y se agrega tanta agua, de manera que se alcance una concentración de acetato amónico de 0,05-m. Se separa por centrifugación una pequeña cantidad de material no disuelto y la solución sobrenadante se cromatografía en una columna de SP-Sephadex<sup>(R)</sup> C 25 equilibrada con solución 0,05-m de acetato amónico del pH 6,8 (2,5 x 80 cm) (Sephadex<sup>(R)</sup> = dextrano reticulado). La columna se eluye primeramente con 500 cc de solución de acetato amónico 0,05-m del pH 6,8 y a continuación con 500 cc de solución de acetato amónico 0,5-m del mismo pH. El perfil de la elución está reflejada en la figura 1. Las distintas fracciones A hasta F (véase figura 1) se secan por congelación y los liofilizados se desalan en parte por cromatografía en Biogel P 2 con hidróxido amónico 0,1-m como eluyente, en parte por ultrafiltración. Los rendimientos y los datos espectroscópicos de los preparados obtenidos de las distintas fracciones se han resumido en la tabla A y los resultados de los análisis cuantitativos de aminoácidos en la tabla C. En la figura se ha presentado sobre la ordenada la extinción en porcentajes y sobre la abcisa la denominación de la correspondiente fracción A hasta F. En el punto W se cambia el eluyente (solución de acetato amónico 0,5 en lugar de solución de acetato amónico 0,5-m).

EJEMPLO 34 B.-

500 mg de BPTI se hacen reaccionar como descrito en el ejemplo 34 A con nitrito sódico en solución ácido acética. Después de 24 horas se ajusta el pH a 9,0 mediante adición de amoníaco acuoso concentrado, la solución se desala como descrito en el ejemplo 34A por ultrafiltración. Las partes de alto peso molecular se separan por cromatografía en una columna de Sephadex <sup>(R)</sup> G 50 (2,5 x 100 cc) con solución de amoníaco 0,1-m. Después de secar por congelación se disuelve el residuo en 10 cc de amoníaco acuoso 0,1-m y se ajusta con ácido acético 0,1-m a un pH de 6,8. La solución clara se aplica como indicado en el ejemplo 34A a una columna de SP -Sephadex <sup>(R)</sup> C-25 (2,5 x 70 cm) y primeramente se eluye con 500 cc de solución de acetato amónico 0,05-m, pH 6,8, seguido de 500 cc de solución de acetato amónico 0,5-m, pH 6,8, y finalmente 200 cc de amoníaco acuoso 0,1-m. El perfil de la eluición se puede comparar con el obtenido según el ejemplo 34A. Los rendimientos y los datos espectroscópicos están representados en la tabla B para las distintas fracciones.

TABLA A: Fraccionación de la mezcla de desamino-BPTI obtenida según el ejemplo 34 A en SP-Sephadex <sup>(R)</sup> C-25.

Fracción nº	Denominación	Cantidad	E $\frac{280 \text{ nm}}{425 \text{ nm}}$
21 - 30	A	224	5,53
31 - 40	B	73	8,57
41 - 52	C	37	6,15
53 - 63	D	87	4,61
75 -105	E	67	16,60
106 -140	F	12	13,25

**TABLA B:** Fraccionación de la mezcla de desamino-BPTI obtenida según el ejemplo 34 B en SP-Sephadex (R) C - 25.

Fracción nº	Denominación	Cantidad	E $\frac{280nm}{425nm}$	
5	19 - 27	A	7	9,0
	28 - 42	B	22	13,3
	43 - 48	C	177	17,4
	49 - 51	D	44	21,2
	52 - 59	E	9	15,5
	113 - 127	F	185	22,1

**TABLA C:** Contenidos en aminoácidos característicos determinados en el análisis de aminoácidos de derivados de desamino BPTI según los ejemplos 34 A y 34 B.

Denominación de la sustancia	Obtención descrita en el ejemplo	Moles de resto aminoácido <sup>2)</sup>	Moles de derivado <sup>1)</sup> de BPTI			
		Glicina <sup>2)</sup>	Alanina <sup>2)</sup>	Tiro <sup>2)</sup>	Lisi <sup>2)</sup>	Argi <sup>2)</sup> sina <sup>2)</sup> nina
BPTI <sup>3)</sup>		6,09	6,00	3,80	4,08	6,01
Derivado de desamino-BPTI, Fr. A		6,18	6,66	2,11	0,27	3,51
Derivado de desamino-BPTI, Fr. B		6,08	6,35	2,83	0	4,27
Derivado de desamino-BPTI, Fr. C	34 A	6,19	6,80	2,61	0	3,95
Derivado de desamino-BPTI, Fr. D		6,81	5,81	2,53	0,18	4,44
Derivado de desamino-BPTI, Fr. E		6,58	6,24	3,32	0	4,40
Derivado de desamino-BPTI, Fr. F		6,31	5,92	2,98	0,25	4,50
Derivado de desamino-BPTI, Fr. A		6,32	6,08	3,51	0,30	3,61
Derivado de desamino-BPTI, Fr. B		5,98	5,61	3,76 <sup>4)</sup>	0,26	3,84
Derivado de desamino-BPTI, Fr. C		6,01	5,62	4,55 <sup>4)</sup>	0,21	4,81
Derivado de desamino-BPTI, Fr. D	34 B	6,49	5,93	3,74	0,14	4,64
Derivado de desamino-BPTI, Fr. E		6,82	5,58	4,72 <sup>4)</sup>	1,06	4,88

Denominación de la sustancia	Obtención descrita en el ejemplo	Moles de resto aminoácido	Moles de derivado de BPTI			1)
			Glicina <sup>2)</sup>	Alanina <sup>2)</sup>	Tiro Lisina	
Derivado de desamino BPTI, Fr. F		6,53	5,58	3,71	0,91	3,92

5

10

15

20

25

30

- 1) El peso molecular de los derivados se asumió con 6511 como para el BPTI de origen natural.
- 2) El contenido en alanina o bien glicina sirven como standard interno. Según las condiciones de elución en el análisis de aminoácidos se eluyen sustancias desconocidas teñibles con ninhidrina junto con glicina y/o alanina, que aparentan entonces mayores contenidos en glicina, y/o alanina.
- 3) Como comparación se recogió un análisis de aminoácidos de BPTI. Los valores teóricos de los correspondientes aminoácidos ascienden: Gly y Ala = 6,0; Tyr = 4,0, Lys = 4,0; Arg = 6,0.
- 4) Un producto de desaminización de lisina se eluye directamente antes de la tirosina. Por esta razón se halla la cresta de tirosina en el cromatograma bien asimétricamente o bien acompañada de una cresta no totalmente resuelta.

#### EJEMPLO 35.-

La solución de 550 mg (85  $\mu$  moles) de BPTI guanidizado [B. Kassell y R. B. Chow, Biochemistry 5, 3449-3453, (1960); J. Chauvet y R. Acher, Biochem, Biophys. Res. Comm. 27, 230-235 (1967)] y 410 mg (1,9 m moles) de L-serin-terc.-butil-éter-terc.-butiléster [H.C. Beyerman y J.S. Bontekoe, Proc. Chem. Soc 1961, 249] en 55 cc de agua se hace reaccionar bajo control del pH a 4,9 con 163 mg de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (850  $\mu$  moles), como descrito en el ejemplo 19. La solución de reacción se desala en

columna de Sephadex G 10 5 x 100 cm por filtración con ácido acético al 50% como eluyente. Después de secar por congelación el eluado que contiene la proteína se mantuvo la solución de la sustancia en 7,5 cc de ácido trifluoroacético anhidro durante 30 minutos bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. La solución diluida con 5 cc de agua se desaló por filtración a través de Sephadex G 10. Por cromatografía en Sephadex G 50 con ácido acético 0,1-m se separaron 51 mg de partes polímeras y se obtuvieron 248 mg de sustancia incolora, (45%).

Movilidad electroforética relativa: - 1,16 (celogel) o bien - 1,08 (electroforesis de disco).

Análisis de aminoácidos: 2,26 Ser/mol, 3,60 Homoarg/mol

BPTI: 1Ser; 4 Lys.

#### EJEMPLO 36.-

Análogo al ejemplo 38 se hacen reaccionar 200 mg de BPTI guanidizado ( $31 \mu$  moles) con 250 mg de hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (1,3 m moles) y 670 mg de di-L-glutaminato-tri-terc.-butilo (1,5 m moles). La solución de reacción se concentró en vacío a 10 cc y el pH de la solución se ajustó a 1,0 con ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se mantiene a continuación durante 10 horas a temperatura ambiente y para separar las sales y las mezclas de bajo peso molecular se filtra la solución a través de Sephadex G 10 con ácido acético 0,1-m como eluyente. Se obtienen 175 mg de sustancia incolora (87%).

Movilidad electroforética relativa: -0,60 (celogel) o bien -0,62 y 0,50 (electroforesis de disco);

Análisis de aminoácidos: 3,95 Glu/mol (BPTI: 3).

EJEMPLO 37.-

La solución de 1,3g (200  $\mu$  moles) de desamido-BPTI -obtenido dejando reposar durante 25 días BPTI de origen natural con ácido clorhídrico 2-n a 22°C y diálisis a continuación y secado por congelación- y 1,2 g de L-serin-terc.-butil-éter-terc.-butiléster (5,5m moles) [H.C. Beyetman y J.S. Bontekoe, Proc. Chem. Soc. 1961, 249] en 100 cc de agua se hacen reaccionar análogo al ejemplo 8 con 960 mg de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. La elaboración realizada después de 24 horas análogo al ejemplo 8 da 1100 mg (84%) de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: - 1,16 (celogel).

950 mg de esta sustancia se tratan para la disociación de los grupos de terc.-butilo en analogía al ejemplo 18 con ácido trifluoroacético anhídrido y la solución se elabora como allí descrito. Después de cromatografiar en Sephadex G 50 con ácido acético 0,1-m como eluyente se obtienen, además de 53 mg de partes polímeras 760 mg (75%) de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: - 0,98 (celogel) o bien - 0,90 (electrofóresis de disco);

Análisis de aminoácidos: 3,61 Ser/mol (BPTI : 1).

EJEMPLO 38.-

490 mg (75  $\mu$  moles) del preparado de desamido-BPTI empleado como producto de partida en el ejemplo 37 se hace reaccionar conforme a la reacción descrita en el ejemplo 37 con L-glutaminato de di-terc.-butilo. El preparado se elabora como allí descrito. Se aislan 485 mg de sustancia incolora (99%).

Movilidad electroforética relativa: - 1,52 (celogel).

480 mg de esta sustancia se utilizan bajo atmósfera de nitrógeno mediante tratamiento con ácido trifluoroacético análogo al ejemplo 21. La mezcla de reacción se elabora en forma correspondiente. Se obtienen así 470 mg (96%) de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: - 0,92 (celogel) o bien - 0,88 (electroforesis de disco);

Análisis de aminoácidos: 6,88 Glu/mol (BPTI : 3).

#### EJEMPLO 39.-

De 650 mg de desamido-BPTI (100  $\mu$  moles) (véase ejemplo 37) y 1420 mg de tri-L-glutaminato de tetra-terc.-butilo (2,25 m moles) se obtienen con ayuda de 405 mg de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (2,1 m moles) según el procedimiento descrito en el ejemplo 38 418 mg de producto de condensación (64%).

Movilidad electroforética relativa: - 0,88 (celogel) o bien -0,82/0,17 (electroforesis de disco);

Análisis de aminoácidos: 9,54 Glu/mol (BPTI:3).

#### EJEMPLO 40.-

520 mg de mono-nitro-BPTI (80  $\mu$  moles) [B. Meloun, I. Frič y F. Šorm, Europ. J. Biochem. 4, 112 (1968)] y 650 mg de glutaminato de di-terc.-butilo (2,5 m moles) se hacen reaccionar como descrito en el ejemplo 10 con ayuda de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. Los grupos terc.-butílicos se disociaron análogo al ejemplo 31 mediante tratamiento con ácido clorhídrico a un valor pH de 0,5-1,0. La solución de reacción se desaló por filtración a través de Sephadex G 10 con ácido acético 0,1-m como eluyente. Se obtienen 480 mg de sustancia amarilla (92%).

Movilidad electroforética relativa: - 0,89 (celogel) o bien

-0,82 y - 0,67 (electroforesis de disco).

Análisis de aminoácidos: 4,01 Glu/mol (BPTI :3);

$$\frac{E_{278}}{E_{430}} = 2,03 \text{ (tampón tris 0,1-m, pH 7,8).}$$

EJEMPLO 41.-

5 De 490 mg de dinitro-BPTI (75  $\mu$  moles) [B. Meloun,  
I. Frič y F. Šorm, Europ. J. Biochem. 4, 112 (1968)] y 1100mg  
de L-serin-terc.-butiléter-terc.-butiléster (5 m moles) se  
obtienen por condensación con ayuda de 670 mg (3,5 m moles)  
de hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodi-  
10 mida y disociación a continuación de los grupos terc.-butilo  
según el procedimiento indicado en el ejemplo 40, 418 mg de  
sustancia amarilla (85%).

Movilidad electroforética relativa: - 0,94 (celogel) o bien  
-0,78 y -0,59 (electroforesis de disco);

15 Análisis de aminoácidos: 2,40 Ser/mol (BPTI : 1);

$$\frac{E_{278}}{E_{430}} = 1,44 \text{ (tampón tris 0,1-m, pH 7,8).}$$

EJEMPLO 42.-

20 Análogo al ejemplo 40 se obtienen al emplear 1300mg  
de dinitro-BPTI (200  $\mu$  moles) y 780 mg de L-glutaminato de  
di-terc.-butilo (3 m moles) 881 mg de sustancia amarilla (68%).

Movilidad electroforética relativa: - 1,31 (celogel) o bien  
- 1,16 (electroforesis de disco);

25 860 mg de la sustancia se tratan análogo al ejemplo  
11 durante 1 hora con 10 cc de ácido trifluoracético anhídrico  
y el producto de reacción se aísla como allí indicado. Después  
de cromatografiar en Sephadex G 50 con ácido acético 0,1-m  
como eluyente se obtienen 550 mg de sustancia amarilla (64%).

30 Movilidad electroforética relativa:- 1,12 (celogel) o bien

- 0,95 (electroforesis de disco);

Análisis de aminoácidos: 4,03 Glu/mol (BPTI : 3);

$$\frac{E_{278}}{E_{430}} = 1,47 \text{ (tampón tris 0,1-M, pH 7,8).}$$

5

EJEMPLO 43.-

650 mg (100  $\mu$  moles) de BPTI guanidizada liberalizada de los iones amonios y acetato por diálisis contra ácido clorhídrico 0,1-N a 4°C [B. Kassell y R. B. Chow, Biochemistry 5, 3449 (1966)], 135 mg de N-hidroxibenzotriazol (1 m mol) y 260 mg de L-glutaminato de di-terc.-butilo (4 m moles) se mezclan con 10 cc de dimetilformamida absoluta. A 4°C se agregan a la suspensión 206 mg de dicitclohexilcarbodiimida y la mezcla de reacción se agita primeramente durante 1 hora a 4°C y durante otras 24 horas a temperatura ambiente. Después se separa el disolvente por destilación en vacío a 50°C y el residuo se agita con 10 cc de ácido trifluoracético anhídrido durante 30 minutos bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se concentra en vacío y el residuo se mezcla con 10 cc de ácido acético al 50%. El material sin disolver se separa por centrifugación y la solución sobrenadante se filtra a través de Sephadex G 10 con ácido acético al 50% como eluyente.

15

20

Después de elaborar como descrito en el ejemplo 1 se obtienen 540mg (83%) de sustancia incolora.

25

Movilidad electroforética relativa: -0,56 u. 0 (celogel) o bien - 0,84 y - 0,74 (electroforesis de disco);  
Análisis de aminoácidos: 7,27 Glu/mol; 1,21 Lys/mol (BPTI : 3 Glu o bien 4 Lys).

EJEMPLO 44.-

30

650 mg (100  $\mu$  moles) de bis-3-aminoestirosil-BPTI

obtenido de dinitro-BPTI [B. Meloun, I. Frič, y F. Šorm, Europ. J. Biochem. 4, 112 (1968)] análogo al ejemplo 44 A se condensan como descrito en el ejemplo 5 en presencia de hidrocloreuro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida con L-glutaminato de di-terc.-butilo y se elabora en forma correspondiente. Se obtienen 509 mg (78%) de producto de condensación incoloro.

Movilidad electroforética relativa: - 1,0 (celogel) o bien -0,95 (electroforesis de disco);

Análisis de aminoácidos: 4,45 Glu/mol; 1,55 Tyr/mol (BPTI: 3 Glu o bien 4 Tyr).

#### EJEMPLO 44 A.-

650 mg (100  $\mu$  moles) de una mezcla de BPTI nitrado [B. Meloun, I. Fric y F. Sorm, Europ. J. Biochem, 4, 112 (1968)] se disuelven en 25 cc de tampón de tris-(hidroximetil)-aminometano 1-n, pH 7,5. Bajo buena agitación se agregan a la solución en dos tandas cada vez 300 mg de ditionita sódica en períodos de 10 minutos y la mezcla se mezcla, 10 minutos después de la última adición, con ácido acético hasta alcanzar un pH de 5,0. Para la desalación se filtra la mezcla de reacción a través de Sephadex G 10 con ácido acético 0,1-n como eluyente. Los eluados que contienen la proteína se secan por congelación. El liofilizado se disuelven en 5 cc de ácido clorhídrico 1-n y después de enfriar se mezcla la solución a 4°C con una solución de 14 mg de nitrito sódico (203  $\mu$  moles) en 100  $\mu$ l de agua bajo buena agitación. Después de 10 minutos se le agregan a la solución 10 mg de ácido amidosulfónico sólido y después de otros 5 minutos una solución previamente enfriada de 94 mg de fenol ( 1 m mol) en 5 cc de lejía sódica 1-n (pH 8,2). La suspensión amarilla se agita bajo adición de

lejía sódica hasta alcanzar un pH de 9,0. En el transcurso de 30 minutos se obtiene una solución roja. Después de agregar ácido acético hasta un pH de 4,0 se desala la solución de reacción por cromatografía en Sephadex H 10. A continuación se separan las partes de alto peso molecular por cromatografía de los eluados que contienen proteína en Sephadex G 50 con ácido acético 0,1-m como eluyente. Se obtienen finalmente 425 mg de sustancia de color naranja amarillo.

#### EJEMPLO 45.-

1,3 g de BPTI (200  $\mu$  moles) se hacen reaccionar según el ejemplo 50 con 2 x 100  $\mu$ l de anhídrido de ácido citracóico (2 m moles). A la solución enfriada con hielo del derivado citracónílico se agregan 4,35 g (20 m moles) de L-serin-terc.-butiléter-terc.-butiléster y después de ajustar un pH de 5,2, 3,85 g de hidrocioruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiisida. La mezcla de reacción se mantiene durante 3 horas a 22°C formándose una suspensión lechosa. El pH de esta suspensión se ajusta con ácido clorhídrico a 1,0 y se agita durante 20 horas. Se forma así una solución clara que se elabora análogo al ejemplo 1. Se obtienen 1050 mg (81%) de liofilizado incoloro.

Movilidad electroforética relativa: -0,56 (celogel) o bien -0,98 y -0,86 (electrofóresis de disco);

Análisis de aminoácidos: 2,96 Ser/mol (BPTI : 1).

Desaminización de derivados de BPTI modificados con carboxilo.-

#### EJEMPLO 46.-

320 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 2 se disuelven en 100 cc de ácido acético 0,25-m libres de 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 una solución 2-m 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 Sephadex G 10 con amoníaco 0,1-m como eluyente. Al liofilizar el eluado que contiene la proteína se obtienen 230 mg (72%) de sustancia amarillenta.

Movilidad electroforética relativa: -0,07 (celogel);

Análisis de aminoácidos: véase tabla 1.

#### EJEMPLO 47.-

Como descrito en el ejemplo 46 se desaminizan 600mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 30 bajo atmósfera de nitrógeno con solución de nitrito sódico en solución ácido acética. Después de la elaboración usual se obtienen 368 mg de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: -0,26 (celogel) o bien -0,67, -0,54 y -0,43 (electroforesis de disco).

#### EJEMPLO 48.-

325 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 2 se hacen reaccionar a un pH de 8,5 con sal diazónica obtenida de 10 mg de 5-aminotetrazol (115  $\mu$  moles). El producto de desaminación se aísla mediante correspondiente elaboración de la mezcla de reacción. Después de filtrar el producto de reacción a través de Sephadex G 10 con solución de bicarbonato amónico 0,05-m como eluyente se obtienen 205 mg (63%) de sustancia incolora.

Movilidad electroforética relativa: - 1,28y -1,5 (doble banda; celogel) o bien - 1,13 y - 1,43 (electroforesis de disco);

Análisis de aminoácidos: véase tabla 1.

Copulación de derivados de BPTI modificados con carboxilo con compuestos de diazonium.

EJEMPLO 49.-

5 La solución de 50 mg de 3,5-dicloroanilina ( $310 \mu$  moles) en 1 cc de una mezcla 1 + 1 de ácido acético y ácido fosfórico al 80% se mezcla a  $4^{\circ}\text{C}$  bajo agitación con una solución de 50 mg de nitrito sódico ( $360 \mu$  moles) en  $10 \mu\text{l}$  de agua. Después de 10 minutos se agregan 30 mg de úrea y la solución de reacción se reúne, después de otros 10 minutos, con  
10 una solución enfriada con hielo de 500 mg del derivado de BPTI, obtenido según el ejemplo 11, en 7,5 cc de solución 0,1-m de tetraborato sódico, pH 9,2. El pH de la mezcla de reacción se ajusta mediante adición de lejía sódica 8-n enfriada con hielo a 8,0 con lo que se forma un precipitado. Después de agitar  
15 durante una hora a  $4^{\circ}\text{C}$  se agregan 50 mg de fenol a la mezcla y ésta se diluye finalmente con 15 cc de ácido acético glacial. La solución intensamente roja, clara, así obtenida se filtra, para separar las partes de bajo peso molecular con ácido acético al 50% como eluyente a través de Sephadex G 10. Del  
20 eluado que contiene la proetina se aislan 300 mg (60%) de sustancia de color naranja.

Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien - 1,0, - 0,-2, -0,67 (electroforesis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 15$  ( a 6,5 g/l, tampón tris 0,1-m, pH 7,2).

25

EJEMPLO 50.-

A la solución de 325 mg del derivado de BPTI ( $50 \mu$  moles) obtenidos según el ejemplo 2, se vierten bajo agitación a  $4^{\circ}\text{C}$   $100 \mu\text{l}$  de anhídrido de ácido citracóico (1,1 m moles), manteniendose el pH de la solución en 8,0 mediante adición de  
30

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 del correspondiente compuesto doazónico obtenida de 32 mg de 3,5-dicloroanilina. La copulación se realiza análogo al ejemplo 49 a un pH de 8,0.

Para la disociación de los grupos citraconílicos se mezcla la mezcla de reacción con 20 cc de ácido acético glacial y se agrega adicionalmente ácido clorhídrico concentrado hasta que la mezcla de reacción halla alcanzado un pH de 3,5. Después de reposar durante 24 horas a 20°C se filtra la solución, para separar los componentes de bajo peso molecular, con ácido acético al 50% a través de Sephadex G 10. Se separan un 10% de productos de reacción polímeros por cromatografía en Sephadex G 50. Al secar por congelación la fracción monómera se obtienen 325 mg de sustancias de color naranja (72,5%).

Movilidad electroforética relativa: -0,05 y -0,90 (celogel) o bien -1,0 (electrofóresis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 24,5 \text{ (a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético } 0,1\text{-M);}$$

Análisis de aminoácidos: véase tabla 1.

#### EJEMPLO 51.-

De 500 mg del derivado de BPTI ( 77  $\mu$  moles), obtenido según el ejemplo 8, se obtienen como descrito en el ejemplo 49 por copulación con el compuesto de diazonium obtenido de 50 mg de 3,5-dicloroanilina, después de separar las sustancias acompañantes de bajo peso molecular por titración de la solución de reacción a través de Sephadex G 10 con ácido acético al 50%, 361 mg (72%) de sustancia de color naranja.

Movilidad electroforética relativa: -0,0 (celogel) o bien, -0,21, -0,42, -0,52, -0,75 y -0,98 (electrofóresis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{325} = 8,0$  (a 6,5 g/l, ácido acético al 50%).

EJEMPLO 52.-

5 500 mg del derivado de BPTI (77  $\mu$  moles), obtenido según el ejemplo 13, se citraconilan análogo al ejemplo 50 y, como allí descrito, se han de reaccionar, para la copulación, con una solución de compuestos de diazonium obtenido de 3,5-dicloroanilina. Después de la disociación de los grupos citraconílicos se obtienen, análogo al ejemplo 50, 325 mg (65%) de sustancia marrón.

10 Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien - 1,05 (electroforesis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 23,5$  (a 6,5 g/l, ácido acético al 50%).

EJEMPLO 53.-

15 De 500 mg del derivado de BPTI (77  $\mu$  moles), obtenido según el ejemplo 10, se obtienen análogo al ejemplo 49 385 mg (77%) de una sustancia naranja-amarillo.

Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien - 1,0 y -0,85 (electroforesis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 14,0$  (a 6,5 g/l, ácido acético al 50%).

20 EJEMPLO 54.-

De 250 mg del derivado de BPTI (38  $\mu$  moles), obtenido según el ejemplo 15, se obtienen, análogo al ejemplo 49, 105 mg (42%) de sustancia amarillo-naranja.

25 Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien - 1,04 (electroforesis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 13,5$  ( a 6,5 g/l, ácido acético al 50%)

Análisis de aminoácidos: véase tabla 1.

EJEMPLO 55.-

De 500 mg del derivado de BPTI obtenido según el

ejemplo 4 se obtienen análogo al ejemplo 49 234 mg de derivado azóico de color naranja amarillo (47%).

Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien

- 1,0, -0,82 y -0,67 (electrofóresis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 10,5 \text{ (a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1\text{-M, pH } 7,5\text{)}.$$

#### EJEMPLO 56.-

De 250 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 21 se obtienen según el procedimiento descrito en el ejemplo 50 por copulación con compuesto de 3,5-diclorobenzodiazonium 208 mg (83%) de derivado azóico rojo ladrillo.

Movilidad electroforética relativa: -0,05 (celogel) o bien

- 1,11 (electrofóresis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 36,0 \text{ (a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético al } 50\%\text{)}.$$

Análisis de aminoácidos: véase tabla 1.

#### EJEMPLO 57.-

De 500 mg del derivado del BPTI obtenido según el ejemplo 6 se obtienen en analogía al ejemplo 49, 363 mg (72%) de derivado azóico de color naranja, que se aísla.

Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien

- 0,85 (electrofóresis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 11,8 \text{ (a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético al } 50\%\text{)}.$$

Análisis de aminoácidos: véase tabla 1.

#### EJEMPLO 58.-

De 500 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 27 se obtienen análogo al ejemplo 49 84 mg (17%) de compuestos polímeros y 270 mg (54%) de compuestos azóicos monómeros de color naranja.

Movilidad electroforética relativa: -0,05 (celogel) o bien

- 1,11 (electrofóresis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 9,05 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético al } 50\%)$$

Análisis de aminoácidos: veáse tabla 1.

EJEMPLO 59.-

De 250 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 28 se obtienen, como descrito en el ejemplo 50, por citraconilización y reacción del producto de reacción con 3,5-dicloroanilina diazotada, después de disociar los restos citraconílicos, 192 mg del derivado de azo-BPTI marrón (77%). Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien

- 1,05 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 14,75 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1\text{-M, pH } 7,5).$$

EJEMPLO 60.-

De 125 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 24 se obtienen en analogía al ejemplo 49 147 mg de sustancia de color naranja.

Contenido en proteína: 75%.

Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien

- 1,02 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 14,45 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético } 0,1\text{-M}).$$

EJEMPLO 61.-

De 250 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 21 se obtiene análogo al procedimiento descrito en el ejemplo 50, después de citraconilización por copulación del producto de reacción con compuesto de diazonium obtenido de 3,5-dicloroanilina y disociación de los restos citraconílicos, 202 mg de derivado azóico de color naranja.

Movilidad electroforética relativa: -0,13 (celogel) o bien

-0,96 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 15,8 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l ácido acético } 0,1\text{-M}).$$

EJEMPLO 62.-

250 mg (38  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 25 se citraconilizan como descrito en el ejemplo 50 y el derivado citraconílico se copula a un pH de 8,5 análogo al método descrito en el ejemplo 50 con una solución de compuesto de diazonium obtenida en la forma usual de 28 mg (330  $\mu$  moles) de 3-amino-1,2,4-triazol en 5 cc de ácido clorhídrico 1-n con 25 mg de nitrito sódico (365  $\mu$  moles). Después de dosificar los grupos citraconílicos análogo al ejemplo 50 se desala el producto de reacción en Sephadex G 10 con ácido acético al 50% como eluyente. Se aislan 178 mg (71%) de un derivado azóico marrón rojizo.

Movilidad electroforética relativa: -0,74 y - 1,08 (celogel) o bien - 1,06 (banda pral. ,electrofóresis de disco).

$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 22,6$  (a 6,5 g/l, ácido acético 0,1-m).

EJEMPLO 63.-

Análogo al ejemplo 62 se citraconilizan 200 mg del derivado de BPTI del ejemplo 25 (35  $\mu$  moles) como descrito en el ejemplo 50 y el producto de reacción se copula a un pH de 8,5 con sal de diazonium obtenida de 27 mg de 5-aminotetrazol (320  $\mu$  moles) y 25 mg de nitrito sódico en 5 cc de ácido clorhídrico 1-n. La solución de reacción se elaboró como descrito en el ejemplo 54. Se obtienen 183 mg de derivado azóico de color naranja.

Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien - 1,04, -0,94, -0,84 (electrofóresis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 5,2$  (a 6,5 g/l, ácido acético 0,1-m).

EJEMPLO 64.-

250 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejem-

plo 20 se disuelven en 5 cc de solución 0,1-m de tetraborato  
 sódico y se citraconiliza según el método indicado en el  
 ejemplo 50. El compuesto así obtenido se hace reaccionar como  
 descrito en el ejemplo 50 para su copulación a un pH de 8,0  
 con la solución del compuesto de diazonium obtenido de 25 mg  
 de 3,5-dicloroanilina. Después de desalar el producto de  
 reacción y cromatografiar a continuación en Sephadex G 50  
 se obtienen 128 mg (52%) de derivado azóico marrón-naranja.  
 Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien  
 -1,0 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 10,8 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1\text{-m, pH } 7,5).$$

#### EJEMPLO 65.-

325 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejem-  
 plo 2 (50  $\mu$  moles) se citraconiliza como descrito en el  
 ejemplo 50. El compuesto citraconílico se copula a un pH de  
 8,0 con el compuesto de diazonium obtenido de 21 mg de 3-  
 amino-1,2,4-triazol (250  $\mu$  moles). La mezcla de reacción  
 se elabora análogo al ejemplo 50. Por cromatografía en Se-  
 phadex <sup>(R)</sup> G 50 se obtienen 39 mg (9%) de partes polímeras y  
 212 mg ( 65%) de derivado azóico rojo-naranja.

Movilidad electroforética relativa: 0,0 (celogel) o bien  
 -1,14 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 26,7 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1\text{-m, pH } 7,5);$$

Análisis de aminoácidos: veáse tabla 1.

#### EJEMPLO 66.-

590 mg (90  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido  
 según el ejemplo 19 se citraconilizan análogo al ejemplo 50  
 y el derivado citraconílico se copula, como allí descrito, con  
 el compuesto de diazonium obtenido de 31,5 mg de 3-amino-1,2,4-

triazol. La solución de reacción obtenida después de disociar los restos citraconílicos se desala en Sephadex G 10. Por cromatografía en Sephadex <sup>(R)</sup> G 50 se obtiene, además de 30mg de partes polímeras, 330 mg (56%) de sustancia de color naranja.

Movilidad electroforética relativa: - 1,0 (celogel) o bien - 1,08 (electroforesis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 4,2$  ( a 6,5 g/l, tampón tris 0,1-m, pH 7,8);

#### EJEMPLO 67.-

De 350 mg (55  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 30 se obtienen análogo al procedimiento descrito en el ejemplo 50 por reacción del compuesto citraconílico obtenido intermediariamente con el compuesto de diazonium obtenido de 67 mg de 3-amino-1,2,4-triazol, 280 mg de sustancia de color oliva (81%).

Movilidad electroforética relativa: - 0,05 (celogel) o bien - 0,59 y - 0,37 (electroforesis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{320} = 49,5$  ( a 6,5 g/l, tampón tris 0,1-m, pH 7,5).

Análisis de aminoácidos: véase tabla 1.

#### EJEMPLO 68.-

Como descrito en el ejemplo 50 se citraconilizan 520 mg de (80  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 18 y el producto de reacción se copula con el compuesto diazonium obtenido de 67 mg (800  $\mu$  moles) de 3-amino-1,2,4-triazol según el ejemplo 62. Se obtienen 395 mg de sustancia de color oliva (76%).

Movilidad electroforética relativa: 0,4 (celogel) o bien -0,9 y -0,57 (electroforesis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{318} = 53,2$  ( a 6,5 g/l, tampón tris 0,1-m, pH 7,5);

Análisis de aminoácidos: veáse tabla 1.

EJEMPLO 69.-

Al emplear 5-amino-tetrazol en lugar de 3-amino-1,2,4-triazol se obtienen análogo al ejemplo 68 340 mg de sustancia marrón (65%).

5

Movilidad electroforética: -0,48 (celogel) o bien -0,40 y -0,22 (electrofóresis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{315} = 16,4$  (a 6,5 g/l, tampón tris 0,1-m, pH 7,5).

EJEMPLO 70.-

10

De 260 mg (40  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 35 y 3-amino-1,2,4-triazol diazotado se obtiene, análogo al ejemplo 62 205 mg (79%) de derivado azóico de color naranja.

15

Movilidad electroforética relativa: -0,15 (celogel) o bien -0,85 (electrofóresis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{322} = 15,5$  ( a 6,5 g/l, tampón tris 0,1-m, pH 7,5).

EJEMPLO 71.-

20

Por copulación de 520 mg (80  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 37 con el compuesto de diazonium obtenido de 42 mg de 3-amino-1,2,4-triazol (500  $\mu$  moles) y ulterior elaboración análogo al ejemplo 62 se obtienen 350 mg (67%) de derivado de azo-BPTI amarillo-oro.

25

Movilidad electroforética relativa: -0,28 (celogel) o bien -0,49, -0,33 y -0,16 (electrofóresis de disco);

$E \frac{1 \text{ cm}}{315} = 32,8$  ( a 6,5 g/l, tampón tris 0,1-m, pH 7,5).

EJEMPLO 72.-

30

De 520 mg (80  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 38 se obtienen análogo al ejemplo 62 380 mg (73%) de compuesto azóico de color oliva.

Movilidad electroforética relativa: -0,32 (celogel) o bien -0,65, -0,53 y -0,35 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{320} = 42,5 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1\text{-m, pH } 7,5\text{);}$$

5 Análisis de aminoácidos: veáse tabla 1.

EJEMPLO 73.-

325 mg (50  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 34 se hacen reaccionar análogo al ejemplo 50 con compuesto de 3,5-dicloro-fenil-diazonium a 273 mg (84%) de derivado de azo-BPTI de color naranja.

10

Movilidad electroforética relativa: -0,65 u. -0,35 (celogel) o bien -1,03 u. - 0,85 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{323} = 8,54 \text{ (a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético } 1\text{-m).}$$

15 EJEMPLO 74.-

Análogo al ejemplo 73 se obtienen de 325 mg (50  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 18 285 mg (87%) de compuesto azóico rojo-naranja.

20

Movilidad electroforética relativa: -0,80, -0,29 y 0,0 (celogel) o bien -0,91 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{322} = 17,8 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1\text{-m, pH } 7,5\text{)}$$

EJEMPLO 75.-

De 260 mg (40  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 31 se obtienen análogo al ejemplo 62 255 mg (98%) de derivado de azo-BPTI marrón claro.

25

Movilidad electroforética relativa: -1,0 (celogel) o bien -1,0 y -0,71 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{320} = 24,0 \text{ (a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1\text{-m, pH } 7,5\text{).}$$

EJEMPLO 76.-

De 260 mg (40  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 32 se obtienen en analogía al ejemplo 62 186 mg (72%) de derivado azóico rojo claro.

5 Movilidad electroforética relativa: -1,0 y 0,0 (celogel),  
o bien -0,95 y -0,74 (electrofóresis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{310} = 4,5 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético 1-m).}$$

EJEMPLO 77.-

10 Como descrito en el ejemplo 62 se obtienen de  
325 mg (50  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el  
ejemplo 33 256 mg (79%) de derivado azóico de color naranaj.

Movilidad electroforética relatica: 0,0 celogel o bien  
-0,83 y -0,74 (electrofóresis de disco);

15

$$E \frac{1 \text{ cm}}{328} = 40,6 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético 1-m).}$$

EJEMPLO 78.-

20 306 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejem-  
plo 33 (45  $\mu$  moles) se copulan análogo al ejemplo 62 con  
3-amino-1,2,4-triazol diazotado. Se obtienen 287 mg (94%) de  
derivado azóico marrón.

Movilidad electroforética relativa: -0,05 (celogel) o bien  
-0,95 (electrofóresis de disco);

25

$$E \frac{1 \text{ cm}}{320} = 29,0 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético 1-m).}$$

EJEMPLO 79.-

30 Análogo al ejemplo 62 se obtienen 650 mg del deri-  
vado de BPTI obtenido según el ejemplo 45 563 mg (87%) de  
compuesto azóico de color oliva.

Movilidad electroforética relativa: -0,44 (celogel) o bien

-0,59, -0,47 y -0,31 (electroforesis de disco);

$$E \frac{1 \text{ cm}}{318} = 45,2 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1\text{-M, pH } 7,5\text{).}$$

EJEMPLO 80.-

De 325 mg del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 44 se obtienen análogo al ejemplo 50 con 1,2,4-3-aminotriazol diazotado por copulación a un pH de 3,5 - 4,5 273 mg (84%) de derivado de azo-BPTI de color naranja.

Movilidad electroforética relativa: -0,81 (electroforesis de disco)  $E \frac{1 \text{ cm}}{316} = 23,4 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, ácido acético al } 50\% \text{).}$

EJEMPLO 81.-

De 225 mg (35  $\mu$  moles) del derivado de BPTI obtenido según el ejemplo 43 se obtienen análogo al ejemplo 62 205 mg (91%) de derivado azóico de color rosa.

Movilidad electroforética relativa: -0,35 y 0,0 (celogel) o bien -0,42 y -0,25 (electroforesis de disco)=

$$E \frac{1 \text{ cm}}{320} = 7,8 \text{ ( a } 6,5 \text{ g/l, tampón tris } 0,1\text{-M, pH } 7,5\text{).}$$

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

1.- Procedimiento para la obtención de derivados del inhibidor de tripsina pancreatica básica, en los que solo una parte de los grupos carboxilo de la BPTI de origen natural o de sus derivados están modificados, caracterizado porque BPTI o derivados de la BPTI, que contienen grupos carboxilo libres, se hacen reaccionar con compuestos amino nucleófilos (con excepción del glicinetiléster) en presencia de carbodiimidias, a valores entre 3 y 11, en solución acuosa, que en caso dado contienen también disolventes orgánicos y/o sales y/o agentes de desnaturalización, los productos de reacción obtenidos se aíslan y en caso dado se separan, o los productos de reacción obtenidos a continuación se desaminizan con agentes suministradores de iones nitrosilo o con compuestos de diazonium no copuladores y/o en caso dado se transforman por reacción con compuestos de diazonium copulantes a valores pH entre 1 y 12, en compuestos azoicos y los productos de reacción que se forman en cada caso se aíslan según métodos en sí conocidos.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los derivados nitro- ó dinitro-BPTI se reducen y después de reaccionar con compuestos amino nucleófilos se transforman en presencia de carbodiimidias con compuestos suministradores de iones nitrosilo en derivados de diazonium y estos se copulan con fenoles, aminas aromáticas o heteroaromas.

3.- 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 79 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 30 ABR. 1979

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

J. M. GÓMEZ AGUIRRE Y POMBO  
p. p. Firmador J. Suarez Dine

