

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
 Registro de la Propiedad Industrial

Concedido el Registro de acuerdo  
 con los datos que figuran en el  
 presente descripción y según el con-  
 tenido de la Memoria adjunta.

|       |    |                       |       |
|-------|----|-----------------------|-------|
| 19 ES | 21 | NUMERO                | 20 A1 |
|       |    | 478.204               |       |
|       | 22 | FECHA DE PRESENTACION |       |
|       |    | 1-3-79                |       |



ESPAÑA

**PATENTE DE INVENCION**

|                              |          |         |
|------------------------------|----------|---------|
| 30 PRIORIDADES:<br>31 NUMERO | 32 FECHA | 33 PAIS |
| 78.02.289                    | 2-3-78   | Holanda |

|                        |                                |                                      |
|------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| 47 FECHA DE PUBLICIDAD | 51 CLASIFICACION INTERNACIONAL | 62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA |
|                        | C07C 103/52; A61K 31/195       |                                      |

54 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN PEPTIDO PSICOFAR-  
 MACOLOGICAMENTE ACTIVO.

71 SOLICITANTE (ES)

AKZO N.V.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

IJssellaan 82, Arnhem, HOLANDA

72 INVENTOR (ES)

David de Wied y Hendrik Marie Greven, ambos de nacionalidad  
 holandesa.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

OF.

RESUMEN DE LA INVENCION

Nuevos péptidos biológicamente útiles de fórmula:

$A_1-A_2-L-Phe-X-L-Tre-L-Ser-R_1-Y-L-Ser-R_2-L-Tre-L-Pro-L-Leu-L-$   
Val-L-Tre-B (junto con las composiciones farmacéuticas que  
contienen una cantidad farmacéuticamente efectiva de los  
mismos) donde:

- (a)  $A_1$  y  $A_2$  representan cada uno de ellos un resto aminoácido de fórmula  $H_2N-Alq-CO-$ , donde Alq es un grupo alquilideno de 1 a 6 átomos de carbono inclusive;
- (b) X es un resto aminoácido seleccionado entre el grupo formado por L-Met, L-Met(O), L-Met(O<sub>2</sub>) y L-Leu;
- (c)  $R_1$  y  $R_2$  representan cada uno de ellos un resto aminoácido seleccionado entre el grupo formado por L-Glu y L-Gln;
- (d) Y representa un resto aminoácido seleccionado entre el grupo formado por L-Lis y D-Lis y
- (e) B representa uno de los restos aminoácidos o péptidos seleccionados entre L-Leu-OH, D-Leu-OH, L-Leu-L-Phe-OH, L-Leu-L-Phe-L-Lis-OH, L-Leu-L-Phe-D-Lis-OH, L-leucinol y L-MeLeu-OH.

o un derivado funcional de los mismos; estos péptidos presentan propiedades psicofarmacológicas capaces de acelerar la inhibición de la respuesta al vuelo condicionada, de manera que son eminentemente adecuados para el tratamiento de ciertos trastornos mentales en los que se desea una reducción de la función cerebral; más especialmente, los péptidos presentan actividad neuroléptica. Los péptidos de fórmula (I) donde uno de los radicales  $R_1$  o  $R_2$  es L-Glu y el otro L-Gln son los preferidos y resultan especialmente adecuadas las composiciones que contienen los péptidos de fórmula (I) donde  $R_1$  es L-Glu y  $R_2$  es L-Gln.



1 fragmentos peptídicos más pequeños de la  $\beta$ -endorfina, por  
ejemplo  $\beta$ -LPH-(61-76) ( $\alpha$ -endorfina), el fragmento  $\beta$ -LPH-  
5 (61-69) y el fragmento  $\beta$ -LPH-(61-65) (Met-enkefalina) pre-  
sentan cierta afinidad por el receptor de opiáceos. Véase Nature  
258, 577 (1975).

También se ha descrito una afinidad por el receptor  
de opiáceos para el péptido endógeno Leu-enkefalina {Leu<sup>65</sup>} - $\beta$ -  
LPH-(61-65) y para la D-Ala-Met-enkefalina sintética  
10 {D-Ala<sup>62</sup>} - $\beta$ -LPH-(61-65). Véase, por ejemplo, Science 194,  
330 (1976).

Además, también se ha comprobado que la  $\beta$ -endorfina,  
 $\beta$ -LPH-(61-91), posee ciertas propiedades psicofarmacológicas.  
Por ejemplo, este péptido inhibe la extinción de la respues-  
ta al vuelo (activa) en el conocido ensayo de trepar a un  
15 poste (comportamiento de evitación del salto al poste).  
Esta propiedad de la  $\beta$ -endorfina no puede ser disminuída  
por los antagonistas conocidos de la morfina, tales como  
la naloxona o la naltrexona, de manera que es ciertamente  
justificable que el experto en este campo llegue a la con-  
20 clusión de que la actividad psicofarmacológica de la  $\beta$ -endor-  
fina es completamente independiente de los centros recepto-  
res de opiáceos en el cerebro.

Aparte de la  $\beta$ -endorfina, los fragmentos peptídicos  
más pequeños derivados de este polipéptido, a saber la  $\alpha$ -en-  
25 dorfina, el fragmento  $\beta$ -LPH-(61-69) y la Met-enkefalina, se-  
gún se ha demostrado, inhiben la extinción de la respuesta  
de vuelo de forma similar.

El péptido  $\gamma$ -endorfina,  $\beta$ -LPH-(61-77), que solamen-  
te difiere de la  $\alpha$ -endorfina por la presencia de un amino-  
30 ácido extra en el extremo C-terminal, también ha resultado

1 presentar actividad psicofarmacológica aunque de una natu-  
raleza completamente diferente a la de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -endorfina.  
Mientras la  $\alpha$ -endorfina retarda esta extinción de la respues-  
ta de vuelo, se ha demostrado que la  $\gamma$ -endorfina, por el con-  
5 trario, acelera la extinción de la respuesta de vuelo. Es  
notable que la mera adición de un resto aminoácido a la par-  
te C-terminal de la  $\alpha$ -endorfina produzca una inversión tan  
espectacular del comportamiento.

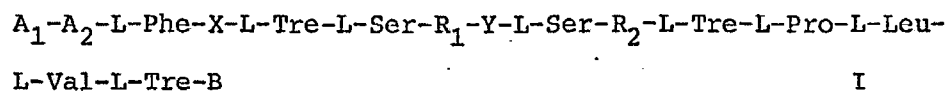
10 Sorprendentemente, ahora se ha hallado que los pépti-  
dos con una secuencia de aminoácidos  $\beta$ -LPH-(62-77) o los  
análogos estrechamente relacionados derivados de un péptido  
de este tipo, aceleran la extinción de la respuesta al vue-  
lo en mayor grado que en el caso de la  $\gamma$ -endorfina. Además,  
15 estos péptidos de acuerdo con la invención, en contraste  
con la  $\gamma$ -endorfina, no poseen afinidad por los receptores  
de opiáceos.

En la patente estadounidense 4.097.471 (Sarantakis)  
se describe un péptido de fórmula H-Tir-Gli-Gli-Phe-Leu-Tre-  
Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-OH o una sal del  
20 mismo. La patente estadounidense 4.127.517 (Coy) describe  
un péptido de fórmula H-Tir-X-{Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-  
Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre}-Leu-Phe-Lis-Asn-Ala-Ile. La  
patente estadounidense 4.127.518 (Coy) describe un péptido  
de fórmula H-Tir-X-{Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-  
25 Pro-Leu-Val-Tre}-Leu-Y, donde Y es OH, alcoxi o amina y las  
sales del mismo. La patente estadounidense 4.127.519 des-  
cribe un péptido de una fórmula análoga al de la patente  
4.127.518, donde el radical Leu que se encuentra fuera de  
la porción entre corchetes ha sido sustituido por un radi-  
30 cal Leu-Phe. La patente estadounidense 4.127.520 también

1 describe un péptido análogo al de la patente 4.127.518 pero  
sustituye el radical Leu-Y de esta última patente por un  
radical Leu-Phe-Lis-Y.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 Sorprendentemente, se han encontrado nuevos péptidos  
de fórmula:



donde:

- 10 (a)  $A_1$  y  $A_2$  representan cada uno de ellos un resto L-amino-  
ácido de fórmula  $H_2N-Alq-CO$ , donde Alq es un grupo  
alquilideno de 1 a 6 átomos de carbono;
- (b) X es un resto aminoácido seleccionado entre el grupo  
formado por L-Met, L-Met(O), L-Met(O<sub>2</sub>) y L-Leu;
- 15 (c)  $R_1$  y  $R_2$  representan cada uno de ellos uno de los restos  
aminoácidos seleccionados entre el grupo formado por  
L-Glu y L-Gln;
- (d) Y representa un resto aminoácido seleccionado entre el  
grupo formado por L-Lis y D-Lis y
- 20 (e) B representa uno de los restos aminoácidos o péptidos  
seleccionados entre L-Leu-OH, D-Leu-OH, L-Leu-L-Phe-OH,  
L-Leu-L-Phe-L-Lis-OH, L-Leu-L-Phe-D-Lis-OH, L-leucinol  
y L-MeLeu-OH;

o un derivado funcional adecuado del mismo.

25 Son especialmente preferidos los péptidos (y las com-  
posiciones que contienen una cantidad efectiva de los mismos)  
en los que uno de los radicales  $R_1$  o  $R_2$  es L-Glu y el otro  
es L-Gln, en especial donde  $R_1$  es Glu y  $R_2$  es Gln. Por "alqui-  
lideno de 1 a 6 átomos de carbono", se entiende un hidrocar-  
30 buro alquilidénico de 1 a 6 átomos de carbono, no sustituf-

1 do con otros radicales; la especie "alquilideno" puede incluir compuestos de cadena lineal o de cadena ramificada.

5 Los restos aminoácidos cubiertos por A<sub>1</sub> y/o A<sub>2</sub> son, por ejemplo, glicilo, alanilo, valilo, leucilo o isoleucilo, preferiblemente Gli y L-Ala.

DESCRIPCION DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

10 Los péptidos y derivados peptídicos de fórmula general I se preparan mediante diversas etapas, todas ellas conocidas por los expertos en este campo. Los métodos más frecuentemente utilizados para la preparación de los compuestos de esta invención pueden ser resumidos como sigue en tres procedimientos posibles y diferentes:

(a) condensación en presencia de un agente condensante de

15 (1) un aminoácido o un péptido conteniendo un grupo carboxilo libre (en el que los otros grupos reactivos han sido protegidos) con (2) un compuesto (aminoácido, péptido o amina) conteniendo un grupo amino libre (y en el que los otros grupos reactivos han sido análogamente protegidos); o

20 (b) condensación de (1) un aminoácido o un péptido conteniendo un grupo carboxilo activado y en el que los otros grupos reactivos han sido opcionalmente protegidos, con

25 (2) un compuesto (aminoácido, péptido o amina) conteniendo un grupo NH<sub>2</sub> libre y en el que los otros grupos reactivos han sido protegidos; o

30 (c) condensación de (1) un aminoácido o un péptido conteniendo un grupo carboxilo libre (y en el que los otros grupos reactivos han sido protegidos) con (2) un compuesto (aminoácido, péptido o amina) conteniendo un grupo amino activado (y en el que los otros grupos reactivos han si-

1 do opcionalmente protegidos); después de lo cual, si se desea, se eliminan los grupos protectores.

5 Los métodos de activación del grupo carboxilo son conocidos por los expertos en este campo e incluyen la conversión de los mismos en un haluro de ácido, una azida, un anhídrido, una imidazolidina o un éster activo tal como el éster de N-hidroxisuccinimida o el éster p-nitrofenílico.

10 El grupo amino puede ser activado por métodos conocidos por los expertos en este campo, como la conversión del grupo amino en una amida de fosfito o utilizando el método "fósforo-azo". Para ambos métodos de activación véase la siguiente referencia: Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, cuarta edición, volumen XV/2 (Georg Thieme Verlag), incorporada aquí por referencia.

15 Los métodos más habituales para las reacciones de condensación antes citadas son los siguientes: el método de la carbodiimida, el método de la azida, el método del anhídrido mixto y el método del éster activo, como describen E. Schröder y K. Lubke, "The Peptides", volumen I, 1965 (Academic Press), incorporada aquí por referencia. El llamado método "en fase sólida" de Merrifield, descrito en J. Amer.Chem.Soc. 85, 2149 (1963), también incorporado aquí por referencia, puede ser utilizado asimismo para la preparación de los péptidos y derivados peptídicos aquí descritos.

25 Los grupos reactivos que no participan en la reacción de condensación son eficazmente protegidos mediante los llamados grupos "protectores" adecuados que, a su vez, más tarde pueden ser fácilmente separados por hidrólisis o reducción. Así, un grupo carboxilo puede ser eficazmente protegido por métodos conocidos, por ejemplo esterificación con

30

1 por lo menos una cantidad estequiométricamente efectiva de  
metanol, etanol, ter-butanol, alcohol bencílico o alcohol  
p-nitrobencílico, o, alternativamente, por conversión por  
5 medios conocidos en una amida, como describen, por ejemplo,  
Houben-Weyl, en Methoden der Organischen Chemie, cuarta edi-  
ción, volumen XV/1, pág. 315 y siguientes. Sin embargo, es-  
te último grupo protector es muy difícil de separar, de ma-  
nera que es recomendable utilizar solamente este grupo pa-  
ra proteger el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal en  
10 el péptido final o el grupo  $\gamma$ -carboxilo del ácido glutámico.  
En este caso, la síntesis de los péptidos conduce directamen  
te a la amida del péptido de acuerdo con la fórmula general (I).

Los grupos que pueden proteger eficazmente un grupo  
15 amino son generalmente grupos ácidos adecuados, por ejemplo  
un grupo ácido derivado de ácidos carboxílicos alifáticos,  
aromáticos, aralifáticos o heterocíclicos adecuados (tales  
como ácido acético, ácido benzoico, ácido piridincarboxíli-  
co) o un grupo ácido derivado del ácido carbónico (tales  
como etoxicarbonilo, benciloxicarbonilo, ter-butiloxicarbo-  
20 nilo o p-metoxibenciloxicarbonilo) o un grupo ácido derivado  
de un ácido sulfónico (tales como bencenosulfonilo o p-to-  
luensulfonilo). También pueden utilizarse otros grupos, co-  
mo grupos arilo o aralquilo sustituidos o no sustituidos,  
por ejemplo bencilo y trifenilmetilo o grupos como o-nitro-  
25 fenilsulfenilo o 2-benzoil-1-metilvinilo (véase Houben-Weyl,  
volumen XV/1, pág. 46 y siguientes).

Es preferible proteger también el grupo  $\epsilon$ -amino de  
la lisina y opcionalmente los grupos hidroxilo de la serina  
y de la treonina. Esta última protección, sin embargo, no  
30 es siempre necesaria. Los grupos protectores habituales en

1 este caso son los grupos ter-butiloxycarbonilo o tosilo para el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina y un radical ter-butilo o bencilo para el grupo hidroxilo de la serina y de la treonina.

5 Los grupos protectores pueden ser separados por diversos métodos convencionales, que dependen de la naturaleza del grupo de que se trate, por ejemplo empleando ácido trifluoracético o por reducción suave, por ejemplo con hidrógeno y un catalizador como paladio o con HBr en ácido acético glacial.

10 Los péptidos de esta invención, con el resto aminoácido L-Met(O) pueden ser preparados a partir del correspondiente péptido que contiene el grupo Met mediante oxidación suave, por métodos conocidos en este campo, por ejemplo con peróxido de hidrógeno diluido o con un perácido. Esta oxidación da lugar a una mezcla de S- y R-sulfóxido, que puede ser resuelta en los diastereoisómeros separados por métodos conocidos, por ejemplo por cristalización selectiva. Los diastereoisómeros separados también pueden obtenerse directamente empleando L-metionina-S(o R)-sulfóxido en la síntesis del péptido.

15 Los sulfona-péptidos de acuerdo con esta invención, con el resto aminoácido Met(O<sub>2</sub>), pueden ser obtenidos por oxidación del correspondiente Met-péptido (I) o utilizando metionina-sulfona en la síntesis del péptido.

25 Por el término "derivados funcionales adecuados" de los péptidos de fórmula general (I) se sobreentienden los siguientes derivados:

30 (a) sales de los péptidos de esta invención, en especial las sales de adición de ácidos y las sales metálicas;

1 (b) ésteres derivados preferiblemente de alcoholes alifáti-  
cos de 1 a unos 18 átomos de carbono, en especial de  
alcanoles de 1 a unos 6 átomos de carbono, como metanol,  
5 etanol, propanol, isopropanol, butanol, alcohol sec-bu-  
tílico, alcohol amílico, alcohol isoamílico y alcohol  
hexílico;

(c) amidas o amidas mono-alquílicas o di-alquílicas. donde  
el o los grupos alquilo contienen de 1 a unos 6 átomos  
de carbono; preferiblemente metilo o etilo;

10 (d) derivados N-acilados, obtenidos a partir de un ácido car-  
boxílico alifático de 1 a unos 6 átomos de carbono y

(e) complejos metálicos, formados por puenteo de los pépti-  
dos aquí citados en contacto con una sal, hidróxido u  
15 óxido escasamente solubles de un metal, preferiblemen-  
te cinc.

Las sales pueden obtenerse directamente del medio de  
reacción en el que se preparan los péptidos o pueden ser pre-  
paradas más tarde mediante la reacción del péptido con una  
base.

20 Las sales de adición de ácidos mencionadas en el pá-  
rrafo (a) anterior pueden obtenerse directamente aislando  
el péptido del medio ácido deseado o bien el péptido obteni-  
do puede convertirse más tarde en la sal de adición de áci-  
do por reacción del péptido con un ácido como HCl, HBr, áci-  
do fosfórico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido maléico,  
25 ácido tartárico, ácido cítrico, ácido poliglutámico o car-  
boximetilcelulosa, etc.

Las sales metálicas mencionadas en el párrafo (a)  
anterior, en especial las sales de metales alcalinos, se  
30 obtienen por reacción del péptido con la base metálica de-

1 seada, por ejemplo NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, etc.

5 Los derivados N-acilados mencionados en el párrafo (d) anterior, por los que se entiende específicamente los derivados acilados N-terminales, se preparan preferiblemente empleando en la síntesis del péptido un aminoácido que ya lleva el grupo acilo deseado. Este grupo acilo funciona entonces también como grupo protector durante la síntesis del péptido. De esta forma, se preparan directamente los derivados acilados deseados. Sin embargo, también es posible 10 introducir más tarde el grupo acilo deseado, por acilación del péptido en la forma habitual conocida por los expertos en este campo.

El grupo N-acilo más preferido es el grupo acetilc.

15 Los ésteres y amidas de (b) y (c) también se preparan preferiblemente utilizando en la síntesis del péptido un aminoácido que ya contenga el grupo éster o amida deseado; sin embargo, también pueden ser preparados más tarde por esterificación del péptido obtenido en la forma habitual para los expertos en este campo o por conversión del mismo en 20 una amida.

Las amidas de (c) más preferidas son las amidas sustituidas, v.g. las monometil- o dimetil-amidas o las monoetil- o dietil-amidas.

25 Los complejos metálicos de (e) pueden ser obtenidos poniendo el péptido en contacto con sales, hidróxidos u óxidos metálicos escasamente solubles. Generalmente se utilizan como sales metálicas escasamente solubles los fosfatos, pirofosfatos y polifosfatos metálicos. Los metales que pueden utilizarse en este procedimiento son los que pertenecen a 30 los subgrupos "b" del Sistema Periódico, por ejemplo cobalto,

1 níquel, hierro y preferiblemente cinc, así como los metales  
de los grupos principales del Sistema Periódico que son capa-  
ces de formar complejos, como magnesio y aluminio. La prepa-  
ración de estos complejos metálicos tiene lugar en la forma  
5 habitual. Por ejemplo, puede obtenerse un complejo metálico  
por adición del péptido y una sal, hidróxido u óxido metáli-  
cos escasamente solubles a un medio acuoso. El complejo metá-  
lico también puede obtenerse por adición de un medio alcali-  
no a una solución acuosa del péptido y una sal metálica so-  
10 luble, de manera que se forme el complejo insoluble de pép-  
tido-hidróxido metálico. El complejo metálico puede también  
obtenerse por adición del péptido, una sal metálica soluble  
y otra sal soluble a un medio acuoso, preferiblemente alcali-  
lino, de manera que se forme "in situ" un complejo insoluble  
15 de péptido-sal metálica.

Los complejos metálicos pueden utilizarse directamente  
sin ningún otro tratamiento en forma de suspensiones o, por  
ejemplo, pueden ser liofilizados y más tarde suspendidos de  
nuevo.

20 Los péptidos de fórmula general I, y sus derivados fun-  
cionales antes definidos, como ya se ha indicado antes, acele-  
ran en grado muy considerable la extinción de la respuesta  
de vuelo (activa) en ratas, en el llamado ensayo de "escala-  
da de un poste".

25 El comportamiento de vuelo pasivo de las ratas también  
es considerablemente reducido utilizando los péptidos de es-  
ta invención.

Además de los efectos citados sobre el comportamiento,  
a dosis más altas, los péptidos aquí mencionados producen una  
30 pronunciada reducción de la deambulaci3n en las ratas, efecto

1 sorprendente que no pudo ser observado con la  $\alpha$ -endorfina  
ni siquiera con la  $\gamma$ -endorfina.

5 Los péptidos de esta invención son además sorprenden-  
tamente activos en el llamado "ensayo prensil". Las ratas  
tratadas con los péptidos de esta invención cuelgan suspen-  
didas sobre el suelo de la jaula con sus patas delanteras  
agarradas a un lapicero durante un tiempo considerablemente  
más largo que las ratas tratadas con solución salina (place-  
bo) o con  $\alpha$ -endorfina.

10 Este perfil farmacológico hace que los péptidos y sus  
derivados aquí citados sean especialmente adecuados para  
uso en el tratamiento de ciertos trastornos mentales en los  
que se desea una reducción de las funciones cerebrales. En  
especial, estos péptidos tienen actividad neuroléptica y,  
15 por lo tanto, son adecuados en el tratamiento, por ejemplo,  
de los síndromes esquizofrénicos.

Los péptidos se utilizan en cantidades eficaces con  
los vehículos conocidos y preferiblemente se emplean a una  
dosis de 1  $\mu$ g a 1 mg por kg de peso corporal al día, según  
20 la forma en que sean administrados. El hombre es tratado pre-  
feriblemente con una dosis diaria de 0,1 a 10 mg aproxima-  
damente y especialmente de 0,5 a 2 mg.

Los péptidos de acuerdo con esta invención pueden ser  
administrados por vía oral, rectal o parenteral, mediante un  
25 vehículo farmacéuticamente efectivo, conocido por los exper-  
tos en este campo. Preferiblemente, se utilizan los péptidos  
en forma de preparados inyectables. Para la inyección, se  
disuelven, suspenden y emulsionan en un fluido adecuado. Mez-  
clados con excipientes y cargas adecuados, los péptidos aquí  
30 citados pueden prepararse también en una forma adecuada para

1 administración oral, como píldoras, tabletas, grageas o cápsulas. Además, los péptidos aquí descritos pueden ser administrados en forma de supositorio o pulverización.

5 Se obtienen preparados especialmente valiosos cuando los péptidos aquí citados se presentan en una forma que les comunica actividad prolongada. Se emplean preferiblemente los complejos metálicos. Estos complejos metálicos pueden obtenerse poniendo en contacto los péptidos con sales, hidróxidos u óxidos metálicos escasamente solubles, conocidos por los expertos en este campo. En general se utilizan como sales metálicas escasamente solubles los fosfatos, pirofosfatos y polifosfatos metálicos.

10 Los péptidos de fórmula general I que son especialmente preferidos son aquéllos donde:

15  $A_1$  y  $A_2$  son Gli o L-Ala,

X representa L-Met, L-Met(O) o L-Met(O<sub>2</sub>),

$R_1$  representa L-Glu,

Y representa L-Lis,

$R_2$  representa L-Gln y

20 B representa L-Leu-OH, D-L-Leu-OH o L-Leu-L-Phe-D-Lis-OH,

así como sus sales de adición de ácidos, ésteres alifáticos inferiores y amidas.

25 En relación con los ejemplos dados a continuación, rigen en ellos las siguientes observaciones y reglas:

I. Si no se da la configuración óptica, es implícita la forma L.

II. Se han utilizado las siguientes abreviaturas para los grupos protectores o activantes empleados:

30 Boc = ter-butiloxicarbonilo

1           tBu = ter-butilo  
            Me = metilo  
            ONp = p-nitrofeniloxi  
            Z = benciloxicarbonilo.

5           III. Se han asignado las siguientes abreviaturas a los  
disolventes o reactivos empleados:

To           = tolueno  
EtOH         = etanol  
Bu           = butanol  
10          Pi           = piridina  
Ac           = ácido acético  
EtOAc        = acetato de etilo  
Am           = alcohol amílico  
I.A.N. o IAN = nitrito de isoamilo  
15          DMF           = dimetilformamida  
THF          = tetrahidrofurano  
DCCI         = diciclohexilcarbodiimida  
DCHU         = diciclohexilurea  
TEA          = trietilamina  
20          TFA           = ácido trifluoracético  
Ag           = agua  
N.E.M.       = N-etilmorfolina  
HOBt         = N-hidroxibenzotriazol.

25          IV. Se han utilizado las siguientes abreviaturas para  
los grupos aminoácidos:

Met           = metionilo  
Met(O)       = sulfóxido de metionilo  
Met(O<sub>2</sub>)      = sulfona de metionilo  
30          Phe           = fenilalanilo  
Pro           = prolilo

|    |       |                                  |
|----|-------|----------------------------------|
| 1  | Ser   | = serilo                         |
|    | Lis   | = lisilo                         |
|    | Tre   | = treonilo                       |
|    | Glu   | = glutamilo                      |
| 5  | Gln   | = glutaminilo                    |
|    | Gli   | = glicilo                        |
|    | Val   | = valilo                         |
|    | Leu   | = leucilo                        |
|    | Ala   | = alanilo                        |
| 10 | MeLeu | = N <sup>α</sup> -metil-leucilo. |

15 Aunque la invención se ha descrito en relación con las realizaciones específicas anteriores, resultarán evidentes al experto en este campo numerosas variaciones y modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención aquí descrita, definida en las reivindicaciones del apéndice e ilustrada en los siguientes ejemplos:

EJEMPLOS - MATERIALES DE PARTIDA

A. Síntesis de Boc-Gli-Gli-Phe-Met-OH y análogos

(1) H-Phe-Met-OMe.HCl

20 Se disuelven 11,83 g de Boc-Phe-Met-OMe (véase Biochemistry, 8, 4183 (1969), aquí incorporado) en 100 ml de cloruro de metileno y después se hace pasar HCl por la solución, durante unos 40 minutos. Después de evaporar la solución a sequedad, se agregan 75 ml de acetato de etilo obteniéndose un precipitado. La sustancia sólida se separa por filtración, se lava con éter de petróleo y se seca. Punto de fusión: 123-124°C.

Rf en To:EtOH (8:2) = 0,43 sobre SiO<sub>2</sub>.

(2) Boc-Gli-Gli-OH

30 El procedimiento seguido es el de Tetrahedron 25, 2119

1 (1976), incorporado aquí. Rf en Bu:Pi:Ac:Ag (4:0,75:0,25:1) =  
0,42 sobre SiO<sub>2</sub>; descomposición a 125°C-127°C.

(3) Boc-Gli-Gli-Phe-Met-OMe

5 Se disuelven 4,43 g de Boc-Gli-Gli-OH, A (2), en 30 ml  
de DMF y se enfría a 0°C, después de lo cual se agrega un  
equivalente de TEA (triethylamina). La mezcla se enfría de  
nuevo a unos -10°C, después se agrega un equivalente (eq)  
de cloroformiato de etilo y la mezcla se agita durante unos  
10 minutos. Se añaden después a la mezcla 6,6 g de H-Phe-Met-  
OMe.HCl (A.1) en 30 ml de DMF y 1,1 eq de TEA, agitando du-  
rante unos 30 minutos a -10°C aproximadamente y después du-  
rante 20 horas a la temperatura ambiente. Después de enfriar  
a unos -10°C, se separa TEA.HCl por filtración y el filtrado  
se evapora a sequedad. El residuo se disuelve en 235 ml de  
15 EtOAc y 55 ml de agua y posteriormente se lava con una solu-  
ción de NaCl al 30 %, HCl 0,1N, solución de NaCl al 30 %,  
solución de NaHCO<sub>3</sub> al 5 % y solución de NaCl al 30 %. Des-  
pués la solución se seca sobre sulfato sódico, se filtra y  
se evapora a sequedad. Punto de fusión: 100-101°C; Rf en  
20 CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) = 0,94 sobre SiO<sub>2</sub>.

(4) Boc-Gli-Gli-Phe-Met-OH

25 Se disuelven 2,62 g del péptido obtenido en A(3) en  
30 ml de dioxano/H<sub>2</sub>O (9:1). Después de agregar 1,2 eq de  
NaOH 2,17N, se agita la mezcla a la temperatura ambiente du-  
rante 1 hora aproximadamente y a continuación se ajusta el  
pH de la mezcla a 6 aproximadamente y se evapora a sequedad.  
El residuo se disuelve posteriormente en 50 ml de EtOAc,  
después de lo cual el pH se ajusta a 2 con HCl 1N. Después  
de lavar tres veces con NaCl al 30 %, secar sobre sulfato  
30 sódico y filtrar, la solución se evapora a sequedad. Rf =

1 0,65. Punto de fusión: 97-98°C.

(5) De forma análoga se preparan los siguientes péptidos:

Boc-Gli-Ala-Phe-Met-OH; Rf = 0,72

Boc-Ala-Gli-Phe-Met-OH; Rf = 0,73

5 Boc-Leu-Gli-Phe-Met-OH; Rf = 0,77.

El sistema utilizado en A(4) y A(5) es Bu:Pi:Ac:Ag  
(4:0,75:0,25:1).

B. Síntesis de H-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc)-OMe y análogos

(1) H-Glu(OtBu)-Lis(Boc)-OMe

10 a) Se disuelven 35,3 g de Z-Glu(OtBu)-OH y 27,0 g de HOBt en 150 ml de DMF y después la mezcla se enfría a -22°C aproximadamente. A continuación se añaden a la mezcla enfriada 29,7 g de H-Lis(Boc)-OMe.HCl en 100 ml de DMF y 1 eq de NEM. El pH de la mezcla se ajusta a 6,4 con NEM y después se agregan 23 g de DCCI. Después de agitar durante unos 15 minutos a -22°C aproximadamente y durante unas 12 horas a la temperatura ambiente, se separa por filtración DCHU y el filtrado se evapora a sequedad.

15 El residuo se disuelve en 400 ml de EtOAc y posteriormente se lava con una solución de NaCl al 15 %, una solución de KHSO<sub>4</sub> al 5 %, una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 5 % y una solución de NaCl al 15 %. Después de secar y filtrar, el filtrado se evapora a sequedad. El residuo se cristaliza en éter/éter de petróleo (1:2). Rendimiento: 86,6 %; punto de fusión: 25 54-56°C.

b) El péptido obtenido en B(1) se disuelve en DMF, después se agrega paladio al 10 % en carbón y se hace pasar hidrógeno hasta que cesa el desprendimiento de CO<sub>2</sub>. Después de filtrar, el filtrado se evapora a sequedad.

30 Rf en To:EtOH (8:2) = 0,24 sobre SiO<sub>2</sub>.

1           (2) Z-Tre-Ser-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>

Se disuelven 38,05 g de Z-Tre-Ser-OMe (véase Recueil  
83, 255 (1964), incorporado aquí por referencia) en 20 ml  
de etanol y después se agregan 43 ml de hidrato de hidrazina.  
5 Después de agitar durante unas 2 horas, la sustancia sólida  
se separa por filtración, se lava con etanol/éter (1:1) y  
se seca.

Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) = 0,58 sobre SiO<sub>2</sub>; des-  
composición 215-216°C.

10           (3) H-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc)-OMe

a) Se suspenden 1,22 g de la hidrazida obtenida en B  
(2) en 15 ml de DMF y después se agregan 4,28 ml de HCl/DMF  
2,42N. La solución transparente se enfría a -20°C aproximada-  
mente. Después se agregan 0,7 ml de IAN y la mezcla se agi-  
ta durante unos 30 minutos a -20°C aproximadamente.

15 Después se agregan 1,5 g del péptido obtenido en B(1)  
en 10 ml de DMF. Se ajusta el pH de la mezcla de reacción a  
7,2 y la mezcla se introduce en un frigorífico durante unos  
6 días.

20 Después se separa el disolvente por evaporación, se  
disuelve el residuo en EtOAc y se lava la solución resultan-  
te. Por evaporación a sequedad se obtiene una sustancia só-  
lida. Rendimiento: 61,9 %; punto de fusión: 130-132°C.

25 b) De forma similar a la descrita en B(1) (b), el pép-  
tido Z-protégido se hidrogena en metanol con paladio en car-  
bón como catalizador. Rendimiento: 99 %; Rf en Bu:Pi:Ac:Ag  
(38:24:8:30) = 0,73 sobre SiO<sub>2</sub>.

(4) De forma análoga se obtienen los siguientes péptidos  
protegidos:

30           H-Tre-Ser-Glu(OtBu)-D-Lis(Boc)-OMe

1 Rf en Bu:Pi:Ac:Ag (38:28:8:30) = 0,77 sobre SiO<sub>2</sub>;

H-Tre-Ser-Gln-Lis(Boc)-OMe

Rf en Bu:Pi:Ac:Ag (38:24:8:30) = 0,65 sobre SiO<sub>2</sub>.

5 C. Síntesis de Z-Ser-R<sub>2</sub>-Tre-Pro-OH (R<sub>2</sub> = Glu o Gln)

(1) H-Tre-Pro-OtBu

En la forma descrita en B(1), se copulan 0,33 moles de Z-Tre-OH y 0,35 moles de H-Pro-OtBu, con ayuda de HOBT en DMF. Rendimiento: 64 %; punto de fusión: 65-67°C.

10 El Z-Tre-Pro-OtBu obtenido de esta forma se hidrogena en la forma antes descrita (véase B.3.b.). Rf en To:Et-OH (8:2) = 0,10 sobre SiO<sub>2</sub>.

(2) H-Gln-Tre-Pro-OtBu

15 Se disuelven 1,36 g de H-Tre-OtBu en 10 ml de DMF, después de lo cual se añaden 1,93 g de Z-Gln-ONp y la mezcla de reacción se agita durante unas 20 horas a la temperatura ambiente.

20 Después de evaporar la mezcla a sequedad, el residuo se disuelve en EtOAc y se lava consecutivamente con una solución de KHSO<sub>4</sub> al 5 %, una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 5 % y una solución saturada de NaCl. Después la solución se seca sobre sulfato sódico, se filtra y el filtrado se evapora a sequedad. Punto de fusión: 89-90°C; rendimiento: 59 %.

25 El péptido Z-prottegido obtenido se hidrogena en DMF en la forma antes descrita.

Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (8:2) = 0,08 sobre SiO<sub>2</sub>.

(3) Z-Ser-Gln-Tre-Pro-OtBu

30 De forma análoga a la descrita en C(1), se copulan 20,5 g de Z-Ser-OH con el péptido obtenido en C(2) con ayuda de DCCI y BOBT.

Rendimiento: 70 %. Punto de fusión: 104-106°C.

1           (4) Z-Ser-Gln-Tre-Pro-OH

Se agitan 1,43 g del péptido obtenido en C(3) en 15 ml de TFA al 90 %, a la temperatura ambiente, durante unos 30 minutos. Después la mezcla se vierte en éter. El material sólido se separa por filtración, se lava con éter y se seca. Rendimiento: 90 %; punto de fusión: 111-113°C.

Rf en  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Ag}$  (70:30:5) = 0,23 sobre  $\text{SiO}_2$ .

5           (5) Z-Ser-Glu(OtBu)-Tre-Pro-OH

10           El H-Tre-Pro-OMe, obtenido por copulación de Z-Tre-OH y H-Pro-OMe por el método de HOBt/DCCI, seguido de hidrogenación, se copula consecutivamente con Z-Glu(OtBu)-OH y Z-Ser-OH. Ambas reacciones de copulación se llevan a cabo por el método de HOBt/DCCI y después de la primera copulación el péptido Z-protégido obtenido se hidrogena. El péptido resultante, Z-Ser-Glu(OtBu)-Tre-Pro-OMe, es posteriormente saponificado disolviéndolo en dioxano/agua (9:1) y agregando NaOH 0,2N (véase A(4)).

15           Rf en  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Ag}$  (70:30:5) = 0,29 sobre  $\text{SiO}_2$ .

20           D. Síntesis de H-Leu-Val-Tre-(L o D)-Leu-OtBu

          (1) H-Tre-Leu-OtBu

De forma correspondiente a la descrita en J.A.C.S. 95, 877 (1973), incorporada aquí por referencia, se prepara Z-Tre-Leu-OtBu por el método de copulación con HOBt/DCCI.

Punto de fusión: 81,5-83°C.

25           El dipéptido Z-protégido es después hidrogenado en la forma antes descrita.

Rendimiento: 100 %; Rf en  $\text{To}:\text{EtOH}$  (8:2) = 0,20 sobre  $\text{SiO}_2$ .

30           (2) H-Tre-D-Leu-OtBu

Obtenido por hidrogenación de Z-Tre-D-Leu-OtBu, con un

1 punto de fusión de 89-92°C.

Rf en To:EtOH (8:2) = 0,18 sobre SiO<sub>2</sub>.

(3) H-Val-Tre-Leu-OtBu

5 Copulando 7,85 g de Z-Val-ONp con 5,53 g de H-Tre-Leu-OtBu en 160 ml de DMF, en la forma descrita en C(2), se obtiene Z-Val-Tre-Leu-OtBu con un rendimiento del 72 %. Punto de fusión: 127-129°C.

10 Por hidrogenación de este péptido Z-protégido en metanol se obtienen 9,1 g de un producto oleoso. Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (8:2) = 0,60 sobre SiO<sub>2</sub>.

(4) H-Val-Tre-D-Leu-OtBu

Obtenido de forma similar a la descrita en D(3).

Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (8:2) = 0,55 sobre SiO<sub>2</sub>.

(5) H-Leu-Val-Tre-Leu-OtBu

15 Copulando 6,7 g de Z-Leu-ONp y 6,1 g del péptido obtenido en D(3), en 160 ml de DMF, en la forma descrita en C(2), se obtiene el péptido Z-protégido con un rendimiento de 7,7 g (77 %). Punto de fusión: 153-155°C. Este péptido Z-protégido es hidrogenado en metanol. Rf = 0,75 sobre SiO<sub>2</sub>.

20 (6) H-Leu-Val-Tre-D-Leu-OtBu. Rf = 0,80

(7) H-Leu-Val-Tre-leucinol. Rf = 0,50

(8) H-Leu-Val-Tre-MeLeu-OtBu. Rf = 0,68,

preparados de forma similar a la descrita en D(5). Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) sobre SiO<sub>2</sub>.

25 E. Síntesis de Boc-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc)-OMe y análogos

(1) Boc-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc)-OMe

30 Se copulan 2,4 g de Boc-Gli-Gli-Phe-Met-OH, A(4), y 3,15 g de H-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc)-OMe, B(3), con ayuda de 2 eq de HOBt y 1 eq de DCCI, en la forma descrita en B(1).

1 Después de separar por filtración la DCHU el filtrado se evapora a sequedad y el residuo se cristaliza en metanol. Punto de fusión: 207-209°C (descomposición); rendimiento: 61 %.

5 (2) Boc-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc-OH)

Se disuelven 2,92 g del péptido obtenido en E(1) en 30 ml de dioxano/agua (9:1), después de lo cual se agregan a la solución 14,4 ml de NaOH 0,217N. La mezcla de reacción se agita durante 18 minutos a la temperatura ambiente.

10 Después el pH de la mezcla se ajusta a 2 con HCl 1N. Después de la adición de unos 10 ml de agua, cristaliza un sólido que se separa por filtración y se filtra.

Rendimiento: 78 %; punto de fusión: 215-216°C (desc.).

Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) = 0,49 sobre SiO<sub>2</sub>.

15 Los siguientes compuestos se preparan de forma similar:

(3) Boc-Ala-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc)OH

Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) = 0,52 sobre SiO<sub>2</sub>

(4) Boc-Gli-Ala-Phe-Met-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc-OH)

Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) = 0,51 sobre SiO<sub>2</sub>

20 (5) Boc-Leu-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc)OH

Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) = 0,54 sobre SiO<sub>2</sub>

(6) Boc-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu(OtBu)-D-Lis(Boc)OH

Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) = 0,50 sobre SiO<sub>2</sub>

(7) Boc-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Gln-Lis(Boc)-OH

25 Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) = 0,40 sobre SiO<sub>2</sub>

F. Síntesis de H-Ser-R<sub>2</sub>-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-(L o D)-Leu-OtBu

(R<sub>2</sub> = Glu(OtBu) o Gln) y análogos

(1) H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OtBu

30 Se copulan 1,17 g de Z-Ser-Gln-Tre-Pro-OH de C(4) con 930 mg de H-Leu-Val-Tre-Leu-OtBu, D(5), con ayuda de 2 eq de

1 HOBt y 1 eq de DCCI, de acuerdo con el método descrito en  
B(1). Después de separar por filtración la DCHU formada, el  
filtrado se evapora a sequedad y se disuelve en una mezcla  
5 de sec-butanol y  $\text{CHCl}_3$  (2:3), después de lo cual la solución  
se lava y se evapora a sequedad. El residuo se cristaliza  
en DMF/EtOAc (1:20), punto de fusión: 210-212°C. Rendimien-  
to: 72 %.

El péptido Z-prottegido obtenido se hidrogena en meta-  
nol en la forma antes descrita. Rendimiento: 86 %. Rf en  
10  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Ag}$  (70:30:5) = 0,25 sobre  $\text{SiO}_2$ .

Los siguientes péptidos se preparan de forma similar:

(2) H-Ser-Glu(OtBu)-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OtBu, C(5) +  
D(5).

Rf en  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Ag}$  (70:30:5) = 0,35 en  $\text{SiO}_2$ .

15 (3) H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-D-Leu-OtBu, C(4) + D(6).

Rf en  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Ag}$  (70:30:5) = 0,30 en  $\text{SiO}_2$ .

(4) H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-NHCH<sub>3</sub>

Se disuelven 100 mg del péptido Z-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-  
20 Val-Tre-Leu-OH (véase F.5) en 2 ml de DMF, después de lo  
cual la solución se enfría a unos -10°C. Después se agregan  
1 eq de TEA y 1 eq de cloroformiato de etilo y la mezcla se  
agita durante 10 minutos. Después de la adición de un ex-  
ceso de monometilamina, la mezcla se agita durante unos 30  
25 minutos a -10°C aproximadamente y durante 2 horas a 0°C,  
después de lo cual se evapora a sequedad. El residuo se di-  
suelve en una mezcla de sec-butanol y cloroformo (2:3) y  
después la solución se lava, se seca y se evapora a seque-  
dad. Rendimiento: 65 mg; punto de fusión: 223-225°C.

30 La péptido-monometilamida Z-prottegida obtenida se hi-  
drogena en DMF en la forma habitual.

1

Rf en  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Ag}$  (70:30:5) = 0,26 sobre  $\text{SiO}_2$ .

(5) H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OMe

5

Se agitan durante 20 minutos, a la temperatura ambiente, 100 mg del péptido Z-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OtBu (véase F(1)) en 2 ml de TFA al 90 %. Después la mezcla se evapora a sequedad y la materia sólida se separa por filtración y se seca. Se disuelven 80 mg del sólido en DMF y se esterifica con carbonato de cesio y yoduro de metilo por el método descrito en J.O.C. 42, 1286 (1977), incorporado aquí por referencia. El éster metílico del péptido Z-proté-  
10 gido se hidrogena después en DMF en la forma habitual: rendimiento: 45 mg.

10

Rf en  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Ag}$  (70:30:5) = 0,34 sobre  $\text{SiO}_2$ .

(6) H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-Phe-Lis(Boc)-OtBu

15

Se copulan 0,992 g de Z-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OH de F(5) con 540 mg de H-Phe-Lis(Boc)-OtBu en DMF, con ayuda de DCCI (1 eq) y HOBt (2 eq). Después de separar la DCHU por filtración, el filtrado se evapora a sequedad. El residuo se disuelve posteriormente en 75 ml de sec-butanol/cloroformo (2:3) y la solución se lava con agua, HCl 0,1N, solución de NaCl al 5 % y agua, después de lo cual se seca sobre sulfato sódico, se filtra y se evapora el filtrado a sequedad.

20

25

Rendimiento de Z-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-Phe-Lis(Boc)-OtBu: 1 g; punto de fusión: 221-222°C (descomposición).

Este péptido es hidrogenado en DMF con paladio en carbón como catalizador, en la forma antes descrita.

30

Rf en  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{Ag}$  (70:30:5) = 0,27 sobre  $\text{SiO}_2$ .

1

(7) H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-Phe-OtBu

Rf = 0,34 sobre SiO<sub>2</sub>.

(8) H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-MeLeu-OtBu

Rf = 0,30 sobre SiO<sub>2</sub>

5

(9) H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-leucinol

Rf = 0,16 sobre SiO<sub>2</sub>.

(10) H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-Phe-D-Lis (Boc) -OtBu

Rf = 0,48

10

(7), (8), (9) y (10) se preparan en forma correspondiente a la descrita en F(6). Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5)

EJEMPLO 1

Síntesis de H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OH

15

Se disuelven 1,28 g de Boc-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu(OtBu)-Lis(Boc)-OH del párrafo E(2) anterior y 308 mg de HOBT en 10 ml de DMF y la mezcla se enfría a -22°C aproximadamente. Después se añaden a la mezcla enfriada 1,05 g de H-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OtBu (F(1)) en 5 ml de DMF y 1 eq de NEM. El pH de la mezcla se ajusta a 6,5 con NEM y se agregan 247 mg de DCCI. Después de agitar durante 15 minutos a unos -22°C, 8 horas a la temperatura ambiente y finalmente 12 horas a 35°C, bajo nitrógeno, la DCHU formada se separa por filtración y el filtrado se lava y se seca.

20

El precipitado formado se lava y se seca.

25

Rendimiento: 77 %; descomposición a 212-214°C.

Rf en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH:Ag (70:30:5) = 0,79 sobre SiO<sub>2</sub>.

30

En 30 ml de TFA al 90 % se introducen 1,65 g del péptido protegido así obtenido y se agregan algunas gotas de sulfuro de ter-butilo. La mezcla se agita durante una hora a la temperatura ambiente y después se vierte en éter. El sólido

1 do así obtenido se separa por filtración y se seca. Esta sus-  
tancia se disuelve después en 30 ml de ter-butanol/agua (1:1),  
se agrega una resina cambiadora de ion en forma de acetato  
(Lewatit) y la mezcla se agita durante unos 30 minutos. Pos-  
5 teriormente la resina cambiadora de ion se separa por fil-  
tración y el filtrado se evapora a sequedad. Rendimiento: 1,2g.

Rf en Bu:Pi:Ac:Ag (2:0,75:0,25:1) = 0,26 sobre SiO<sub>2</sub>.

La sustancia se purifica por distribución en contracor-  
riente en el sistema disolvente Bu:Ac:Ag (4:1:5). Rendimien-  
10 to: 680 mg.

#### EJEMPLO 2

Síntesis de H-Gli-Gli-Phe-Met(OH)-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-

Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OH

Se disuelven 200 mg del péptido obtenido en el Ejemplo  
15 1 en 20 ml de ácido acético glacial y después se agregan  
0,08 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %. La mezcla se agi-  
ta durante una hora aproximadamente a la temperatura ambien-  
te, después de lo cual se agregan a la mezcla 300 mg de ne-  
gro de platino en ácido acético glacial y se agita durante  
20 15 minutos más aproximadamente.

La materia sólida se separa por filtración y el filtra-  
do se evapora a sequedad.

Rendimiento: 190 mg.

El péptido así obtenido se purifica por cromatografía  
25 con distribución en contracorriente en el sistema disolvente  
Bu:Ac:Ag (4:1:5).

Rendimiento: 150 mg (como acetato).

Rf en Bu:Pi:Ac:Ag (2:0,75:0,25:1) = 0,20 sobre SiO<sub>2</sub>.

EJEMPLO 3

Síntesis de H-Gli-Gli-Phe-Met(O<sub>2</sub>)-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-  
Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OH

Se introducen 200 mg del péptido obtenido en el Ejemplo 1 en 5 ml de agua, después de lo cual se agregan 0,025 ml de molibdato amónico 0,5M, 0,125 ml de HClO<sub>4</sub> y 0,075 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %. La mezcla se agita durante unas 4 horas a la temperatura ambiente y después se agregan 5 ml de ter-butanol/agua (1:1) y una resina cambiadora de ion en forma de acetato. Después de agitar durante unos 30 minutos, la resina cambiadora de ion se separa por filtración y el filtrado se evapora a sequedad.

Rendimiento: 180 g de péptido (en forma de acetato).

Rf en Bu:Pi:Ac:Ag (2:0,75:0,25:1) = 0,23 sobre SiO<sub>2</sub>.

EJEMPLO 4

Los siguientes péptidos se preparan de forma correspondiente a la descrita en el Ejemplo 1:

1. H-Ala-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OH

(E.3 + F.1) Rf = 0,28

2. H-Gli-Ala-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OH

(E.4 + F.1) Rf = 0,27

3. H-Leu-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OH

(E.5 + F.1) Rf = 0,30

4. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-D-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-Val-Tre-Leu-OH

(E.6 + F.1) Rf = 0,27

- 1 5. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Gln-Lis-Ser-Glu-Tre-Pro-Leu-  
Val-Tre-Leu-OH  
(E.7 + F.2) Rf = 0,29
- 5 6. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-  
Val-Tre-D-Leu-OH  
(E.2 + F.3) Rf = 0,33
7. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-  
Val-Tre-Leu-NHCH<sub>3</sub>  
(E.2 + F.4) Rf = 0,31
- 10 8. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-  
Val-Tre-Leu-OCH<sub>3</sub>  
(E.2 + F.5) Rf = 0,37
9. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-  
Val-Tre-Leu-Phe-Lis-OH  
15 (E.2 + F.6) Rf = 0,24
10. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-  
Val-Tre-Leu-Phe-OH  
(E.2 + F.7) Rf = 0,30
- 20 11. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-  
Val-Tre-Leu-Phe-D-Lis-OH  
(E.2 + F.10) Rf = 0,29
12. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-  
Val-Tre-leucinol  
(E.2 + F.9) Rf = 0,28.
- 25 13. H-Gli-Gli-Phe-Met-Tre-Ser-Glu-Lis-Ser-Gln-Tre-Pro-Leu-  
Val-Tre-MeLeu-OH  
(E.2 + F.8) Rf = 0,32

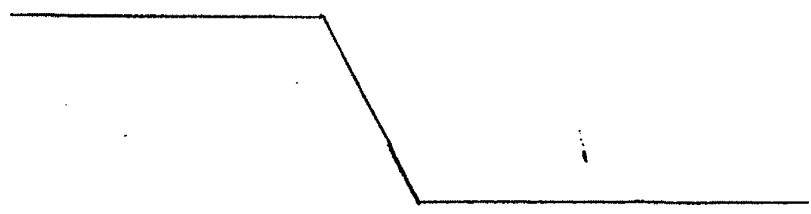
Todos los valores de Rf determinados en Bu:Pi:Ac:Ag  
(2:0,75:0,25:1) sobre SiO<sub>2</sub>.

EJEMPLO 5

Comportamiento de evitación del salto al poste

Unas ratas se entrenaron a saltar a un poste dentro de los 5 segundos siguientes a la presentación del estímulo condicionado (EC) que era una luz situada encima de la jaula. Las ratas que no saltaban dentro de estos 5 segundos recibían choques eléctricos en las patas que trepaban (0,2 mA) como estímulo no condicionado (ENC) hasta que respondían o durante 30 segundos como máximo. Cada día se realizaron diez pruebas en una sola sesión, en un intervalo medio entre las pruebas de 60 segundos. Los intervalos entre las pruebas eran de 40, 60 y 80 segundos, presentados al azar. Las ratas se entrenaron durante 4 días. Al día siguiente de la adquisición del hábito, se estudió la extinción. Durante esta primera sesión después de la adquisición, la falta de respuesta dentro de los 5 segundos subsiguientes al EC no fué seguida del ENC. Todas las ratas recibieron una sesión de extinción de diez pruebas. Los animales que realizaron 8 o más evitaciones se utilizaron para la experimentación subsiguiente. Estas ratas recibieron el péptido o placebo (solución salina) en un volumen de 0,5 ml por rata s.c., inmediatamente después de completada la primera sesión de extinción. La extinción se estudió de nuevo 2 y 4 horas más tarde.

1  
5  
10  
15  
20  
25  
30



1

RESULTADOS

|    | <u>Tratamiento</u>                                       | <u>Extinción (10 pruebas)</u> |           |                      |
|----|--|-------------------------------|-----------|----------------------|
|    |  | <u>0</u>                      | <u>2</u>  | <u>4<sup>1</sup></u> |
|    | γ-Endorfina (referencia)                                 |                               |           |                      |
| 5  | 0,03 μg <sup>3</sup>                                     | 8,8 ± 0,3 <sup>2</sup>        | 6,7 ± 0,8 | 4,0 ± 0,7            |
|    | 0,1 μg   | 9,3 ± 0,3                     | 5,5 ± 0,6 | 2,3 ± 0,4            |
|    | 0,3 μg   | 9,0 ± 0,4                     | 4,6 ± 0,3 | 0,0 ± 0,4            |
|    | Solución salina, 0,5 ml                                  | 9,4 ± 0,4                     | 8,0 ± 0,5 | 7,8 ± 0,7            |
|    | α-Endorfina (referencia)                                 |                               |           |                      |
| 10 | 0,3 μg   | 9,0 ± 0,4                     | 8,3 ± 0,3 | 7,8 ± 0,3            |
|    | Haloperidol (referencia)                                 |                               |           |                      |
|    | 0,03 μg  | 9,3 ± 0,3                     | 6,5 ± 0,7 | 4,0 ± 0,6            |
|    | 0,1 μg   | 9,5 ± 0,4                     | 3,0 ± 0,0 | 0,5 ± 0,4            |
|    | Solución salina, 0,5 ml                                  | 9,8 ± 0,3                     | 9,0 ± 0,4 | 7,8 ± 0,5            |
| 15 | <hr/>  |                               |           |                      |
|    | {Des-Tyr <sup>1</sup> }γ-endorfina                       |                               |           |                      |
|    | 0,01 μg  | 9,0 ± 0,3                     | 6,2 ± 0,4 | 4,2 ± 0,7            |
|    | 0,1 μg   | 8,8 ± 0,4                     | 2,8 ± 1,0 | 1,2 ± 0,5            |
|    | 0,3 μg   | 9,3 ± 0,5                     | 3,0 ± 0,7 | 1,3 ± 0,5            |
| 20 | Solución salina, 0,5 ml                                  | 9,7 ± 0,4                     | 9,7 ± 0,4 | 8,7 ± 0,6            |
|    | {Des-Tyr <sup>1</sup> , Met(O) <sup>5</sup> }γ-endorfina |                               |           |                      |
|    | 0,003 μg   | 9,0 ± 0,3                     | 7,8 ± 0,8 | 4,4 ± 0,9            |
|    | 0,01 μg  | 9,4 ± 0,3                     | 4,8 ± 0,7 | 1,4 ± 0,7            |

25

- 1 Horas después de la inyección
- 2 Media ± E.T.
- 3 Dosis por rata s.c.

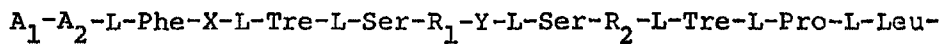
En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

30

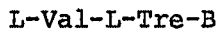
REIVINDICACIONES

1

1. Un procedimiento para la preparacion de un péptido psicofarmacológicamente activo, de fórmula



5



(I)

donde

$A_1$  y  $A_2$  son un resto de un L-aminoácido de fórmula  $H_2N-Alq-CO-$ , donde Alq es un grupo alquilideno de 1 a 6 átomos de carbono;

10

X representa uno de los restos aminoácidos L-Met, L-Met(O), L-Met(O<sub>2</sub>) o L-Leu;

$R_1$  y  $R_2$  representan uno de los restos aminoácidos L-Glu o L-Gln;

Y representa el resto aminoácido L-Lis o D-Lis y

15

B representa uno de los radicales aminoácidos o péptidos siguientes: L-Leu-OH, D-Leu-OH, L-MeLeu-OH, L-Leu-L-Phe-OH, L-Leu-L-Phe-L-Lis-OH, L-Leu-L-Phe-D-Lis-OH o L-leucinol así como los derivados funcionales del mismo cuyo procedimiento se caracteriza porque el péptido arriba indicado en el que al menos el resto aminoácido N-terminal es protegido por un grupo N-protector y opcionalmente también son protegidos otros residuos aminoácidos, es desprotegido por medio de disociación hidrolítica o no hidrolítica catalizada reductiva, ácida o básica, después de lo cual el péptido obtenido puede ser convertido en un derivado funcional.

20

25

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde  $A_1$  y  $A_2$  representan H-Gli o H-L-Ala.

30

3. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 y 2, donde B representa L-Leu-OH, D-Leu-OH o L-Leu-L-Phe-D-

1

Lis-OH.

4. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, donde X representa L-Met, L-Met(O) o L-Met(O<sub>2</sub>).

5

5. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el significado de los radicales es tal que se obtiene H-Gli-Gli-L-Phe-L-Met-L-Tre-L-Ser-L-Glu-(L o D)-Lis-L-Ser-L-Gln-L-Tre-L-Pro-L-Leu-L-Val-L-Tre-(L o D)-Leu-OH, o una sal, un éster alifático inferior o una amida del mismo.

10

6. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que el significado de los radicales es tal que se obtiene H-Gli-Gli-L-Phe-X<sub>1</sub>-L-Tre-L-Ser-L-Glu-(L o D)-Lis-L-Ser-L-Gln-L-Tre-L-Pro-L-Leu-L-Val-L-Tre-(L o D)-Leu-OH, o una sal, un éster alifático inferior o una amida del mismo, donde X<sub>1</sub> representa Met(O) o Met(O<sub>2</sub>).

15

7. Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN PEPTIDO PSICOFARMACOLOGICAMENTE ACTIVO.

20

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

Madrid, 1 de Marzo de 1.979

BERNARDO UNGRIA

25

P.P.



30