



Inl. Cl. cote // cote G; AGIK

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

421641

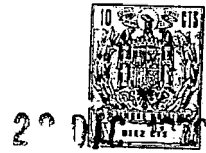
por "PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN PEPTIDO BIOLOGICAMENTE ACTIVO DE LA HORMONA PARATIROIDES HUMANA", a favor de THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES (Gobierno de los Estados Unidos), residente en Washington, D.C. (U.S.A.)

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a péptidos y, mas concretamente, a los 34 residuos terminales amínicos biológicamente activos de la hormona paratiroides humana.

- Durante los últimos años se ha obtenido de una serie de laboratorios un importante cúmulo de informaciones sobre la química, biosíntesis y secreción de la hormona paratiroides (PHT). Estos estudios han indicado que la hormona paratiroides se sintetiza inicialmente como una prohormona, la hormona proparatiroides. La hormona proparatiroides contiene, aproximadamente, 106 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de 12.500. La
- 5.
 - 10.



prohormona se convierte rápidamente en la forma de almacenamiento o glandular de la hormona constituida por 84 aminoácidos y un peso molecular de 9.500. Se han revelado las secuencias completas de aminoácidos de los 84 aminoácidos de la hormona para-

5. tiroides de las especies bovina y porcina. La forma de la hormona paratiroides con peso molecular de 9.500 se segrega en la circulación siguiendo estímulos fisiológicos apropiados. La forma glandular de la hormona, poco después de penetrar en la circulación periférica, se disocia en fragmentos menores. La filtración

10. de gel del suero hiperparatiroides humano llevada a cabo por diversos investigadores ha revelado un fragmento o fragmentos inmunorreactivos principales con un peso molecular de 5-8.000 y varios componentes secundarios. La heterogeneidad inmunoquímica de la hormona paratiroides humana en circulación, debido presumiblemente a las diferentes formas moleculares de la hormona parati-

15. roides, fue revelada inicialmente por Berson y Yalow (J. Clin. Endo Met. 28, 1037-1047 (1968)), habiendo sido conformado por otros. Hasta ahora se desconoce todavía el lugar o lugares concretos de disociación en la cadena polipeptídica de 84 aminoácidos de la

20. hormona paratiroides en la circulación general y no se ha revelado la actividad biológica de los fragmentos resultantes que constituyen la mayor parte de la hormona circulante inmunoquímica. Se ha revelado un fragmento peptídico biológicamente activo de la hormona paratiroides bovina, preparada mediante disociación

25. por ácido diluido, indicando que el polipéptido de 84 aminoácidos intacto no precisa actividad biológica. Este péptido ha sido identificado como el péptido aminoterminal de la hormona y está compuesto por los 30 residuos iniciales de la secuencia (Kentmann y col., Biochem, 11, 1973-1979 (1972)). Se han preparado peptidos



sintéticos de los primeros 34 residuos de la hormona bovina y de los 30 residuos iniciales de la hormona porcina y son biológicamente activos, confirmando por tanto la localización de la zona biológicamente activa de la hormona paratiroides en el

5. tercer terminal amínico de la cadena polipeptídica de 84 aminoácidos. Hasta ahora no se ha identificado la secuencia de los residuos iniciales en la hormona humana. Sin embargo, se desprende que la actividad biológica de la hormona humana debe encontrarse en los primeros 34 residuos.

10. Por consiguiente, un objeto principal del presente invento consiste en obtener la secuencia primaria de los 34 residuos terminales amínicos de la hormona paratiroides humana.

Otro objeto del presente invento consiste en proporcionar un péptido sintético que comprenda los 34 residuos terminales amínicos de la hormona paratiroides humana.

15. Aislamiento e identificación

La hormona paratiroides humana utilizada en estos estudios se aisló de adenomas paratiroides obtenidos de pacientes intervenidos quirúrgicamente de hiperparatiroidismo. Se extrajo

20. primero tejido paratiroides sin grasa y seco con urea 8M en ácido clorhídrico 0,2N y se fraccionó con éter, ácido acético, cloruro sódico y ácido tricloroacético (TCA en polvo), según el procedimiento de Rasmussen y colaboradores de J. Biol. Chem.

25. 239, 2852-2857 (1964). El TCA en polvo se purificó ulteriormente mediante filtración de gel, seguido de cromatografía de intercambio iónico en CM-sephadex utilizando un gradiente de acetato amónico. El aislamiento de la hormona se controló por medio de ensayo radioinmunológico y electroforesis de gel en disco.

El análisis de los aminoácidos se llevó a cabo con un



analizador de aminoácidos automático Beckman-Spinco, modelo 120B o 121 adaptado para un analizador de alta sensibilidad o un analizador Durrum modelo 500. La electroforesis analítica de gel de disco se efectuó en urea 8M con pH 4,4, tal como se ha indicado

5. anteriormente, según Brewer y colaboradores en J. Biol. Chem. 246, 5739-5742 (1970). El ensayo inmunológico se llevo a cabo según el procedimiento de Arnaud y colaboradores, de J. Clin. Invest. 50, 21-34 (1971).

Las degradaciones automatizadas de Edman se efectuaron con el secuenciador de Beckman, modelo 890B, utilizando un tampón de Quadrol 1M. Los aminoácidos de feniltiohidantoina (PTH) se identificaron mediante regeneración en el aminoácido constituyente a través de hidrólisis con ácido yodhídrico durante 20 horas a 130°C.^{1/} cromatografía de gas líquido^{2,3/} y espectrometría de masa.^{4,5,6/}

10. La espectrometría de masa de ionización química se efectuó en un espectrómetro de masa Finnigin equipado con un computador digital PDP-8/e y un trazador Complot. Se utilizó isobutano en calidad de vehículo gaseoso y la fuente se mantuvo a 200°C. Las muestras se aplicaron mediante una sonda de inserción directa y la sonda se calentó entre 30°C y 250°C durante un período de 90 segundos.

15. La espectrometría de masa de impacto por electrones (IE) se llevo a cabo en un espectrómetro de masa LKB, modelo 9000, utilizando una sonda de inserción directa y una energía de electrones de 70eV.

20.

25. ^{1/} Smithies, O., Gibson, D., Fanning, E.M., Goodfliesch, R.M., Gibman, J.C., & Ballantyne, D.L. (1971) Biochem. 10, 4912-4918.

^{2/} Pisano, J.J., & Bronzert, T., (1969) J. Biol. Chem. 244, 5597-5607.

^{3/} Pisano, J.J., Bronzert, T., & Brewer, H.B., Jr. (1972) Anal. Biochem. 45, 43-59.



La hormona paratiroideshumana purificada emigró como un componente único en la electroforesis de gel de disco con una movilidad que resultó idéntica a la de la hormona paratiroidesbovina. El análisis aminoterminal del péptido purificado según la técnica de Edman reveló serina.

Se degradaron 350 nanomoles de la hormona purificada en el secuenciador Beckman utilizando una disociación única de ácido heptofluorobutírico en cada degradación. En la figura 1 se exponen los resultados de la degradación de los primeros 34 residuos de la hormona paratiroideshumana. En cada espectro de masa de ionización química se observó un ión fragmentario "cuasimolecular" (CM^+) o principal. En la etapa 12 de la secuencia se observó un ión cuasimolecular para la glicina (m/e 192) y para la leucina (m/e 249). La cuantificación con el método de cromatografía gaseosa de glicina (0,28 micromoles) y de leucina (0,09 micromoles) permite la identificación definida de la glicina como el doceavo aminoácido de la secuencia, resultando la leucina de la superposición de la etapa 11 (figura 1). La leucina/isoleucina y la lisina/glutamina ofrecen masas idénticas

20.

4/ Hagenmaier, H., Ebbighausen, W., Nicholson, G., & Votsch, W. (1970) Zeitschr Naturforsch 25b, 681-689.

5/ Fairwell, T., & Lovins, R.E. (1971) Biochem. Biophys. Res. Comm. 43, 1280-1289.

25.

6/ Fales, H.M., Nagai, Y., Milne, G.W.A., Brewer, H.B., J.R., Bronzert, T.J., & Pisano, J.J., Anal. Biochem. 43, 288-299 (1971).



de m/e 264 respectivamente en la espectrometría de masa de ionización química. Sin embargo, la lisina puede distinguirse de la glutamina por el ión fragmentario de m/e 306. La lisina/glutamina y la leucina/isoleucina se diferenciaron asimismo

5. fácilmente mediante la cromatografía gaseosa en la mezcla CFC y mediante la espectrometría de masa IE.

Estos resultados combinados proporcionaron una secuencia única y simple para los primeros 34 residuos de la hormona paratiroideshumana (figura 1).

10.

Utilidad

La secuencia aminoácida de los primeros 34 residuos de la hormona paratiroidestiene principal importancia ya que estudios previos de las especies bovina y porcina han indicado que ésta es la región biológicamente activa de la hormona

15. nativa. Los primeros 34 residuos de la hormona paratiroides humana difieren de los del bovino en 6 residuos y del porcino en 5 residuos (figura 2). Los 15 residuos terminales amínicos de la hormona paratiroideshumana y porcina son idénticos, sin embargo la bobina difiere de la paratiroideshumana y porcina en las posiciones 1 y 7, en donde la alanina substituye la serina y la leucina reemplaza la fenilalanina (figura 2).
- 20.

En la región 16-34 restante, la hormona paratiroides humana difiere de la paratiroidesporcina en 5 residuos y de la hormona paratiroidesbovina en 4 residuos (figura 2). La hormona paratiroideshumana contiene 2 residuos de metionina similar a las especies bovinas, mientras que la hormona paratiroidesporcina contiene una metionina única en la posición 8 (figura 2). La secuencia humana es inusual porque contiene 4 residuos básicos consecutivos (el residuo 25 de la arginina y los residuos

25.



26 a 28 de la lisina). Los residuos aminoácidos en los primeros 34, que son únicos para la secuencia humana, incluyen una asparagina en la posición 16, glutamina en la posición 22, lisina en la posición 28 y una leucina en la posición 30.

5. Uno de los principales problemas en el diagnóstico clínico de los pacientes con trastornos del metabolismo mineral ha sido las dificultades encontradas en el ensayo radioinmunológico de la hormona paratiroides. Se han encontrado dos problemas básicos en el ensayo inmunológico de la hormona paratiroides. El primer problema, como se ha expuesto antes, ha sido la presencia en la circulación periférica de fragmentos peptídicos de la cadena polipeptídica de 84 aminoácidos. Los antisueros de diversos laboratorios tienen sin duda, determinantes inmunológicas para distintas regiones de la molécula intacta, conduciendo por tanto a resultados variables y en ocasiones, contradictorias, cuando se aplican para medir la circulación de la hormona paratiroides en la sangre humana.
10. Además, la diferenciación mediante ensayo inmunológico de fragmentos terminales amínicos biológicamente activos de fragmentos inactivos ha sido hasta ahora imposible. La segunda dificultad ha sido la utilización de ensayos heterólogos empleando, en calidad de trazador hormona bovina señalada radioactiva y anticuerpos preparados contra la hormona bovina o porcina. Por consiguiente, la sensibilidad de estos ensayos es variable y depende de la reactividad transversal del antisuero particular con la hormona humana. Según se ha indicado antes, la secuencia humana en solo el tercer inicial de la molécula difiere de la bovina en 6 residuos y de la porcina en 5 aminoácidos.

Habener y colaboradores (Nature New Biology 238



152-154 (1972) ha intentado soslayar algunos de estos problemas del ensayo inmonológico mediante el desarrollo de antisueros específicos amínicos y carboxílicos. Estos investigadores han utilizado un anticuerpo preparado contra la hormona bovina y han

5. absorbido su antisuero con el fragmento bovino 1-34 sintético o con un fragmento 53-84 preparado por disociación química de la hormona bovina nativa. El antisuero específico terminal amínico se caracterizó además por el desplazamiento con fragmentos bovinos sintéticos y el asiento reconocido de este antisuero absorbido

10. mostró estar dirigido hacia los residuos 14 a 19 de la secuencia bovina. Con la utilización de este método han llegado a la conclusión de que el fragmento principal en la circulación humana es el terminal carboxílico y biológicamente activo. Sin embargo, no pudieron identificar el fragmento terminal amínico

15. en la circulación de los sujetos humanos. Esto puede ser debido a la rápida liquidación del antisuero bovino específico terminal amínico con la región terminal amínica de la hormona humana. Es interesante el hecho de que la secuencia humana difiera en la región 14 a 19 de la hormona bovina por la sustitución en la

20. etapa 16 de una asparagina por un residuo de serina (figura 2). Se desconoce todavía la importancia de esta sustitución en la hormona humana frente a los resultados que han obtenido con su antisuero bovino específico terminal amínico. Canterbury y Reiss han revelado resultados sobre la naturaleza del fragmento circulan-

25. te de la hormona paratiroides que contrastan con los revelados por Habener y colaboradores. Estos investigadores, utilizando un antisuero preparado contra la hormona paratiroides bovina, han identificado tres formas inmunoquímicas diferentes de la hormona paratiroides en la circulación periférica de los pacientes de



hiperparatiroides (J. Clin. Invest. (en imprenta) (1973)). El peso molecular de estos tres compuestos, determinado por filtración de gel, resultó de 9500 (supuestamente la paratiroides glandular), 7000-7500 y 4500-5000. Recientemente estos investigadores tuvieron acceso directo a la actividad biológica de estos tres fragmentos en un sistema renal de adenil-ciclase. El fragmento de 9500 y el fragmento de 4500-5000 estimularon el sistema de adenil-ciclase, mientras que el componente de 7000-7500 resultó inactivo. Estos resultados están en consonancia con la presencia de un fragmento activo terminal amínico de hormona paratiroides de una mitad aproximadamente el tamaño de la hormona glandular en el suero hiperparatiroides humano.

Ahora, la determinación de la secuencia terminal amínica de la hormona paratiroides humana permite la síntesis de péptidos basados en la secuencia humana para el empleo clínico y de investigación. Los fragmentos sintéticos, así como sus análogos químicos, permiten llevar a cabo estudios más definidos en la química de la hormona humana, incluyendo los residuos específicos y la longitud mínima de la cadena polipeptídica que se requiere para la actividad biológica. Además, estos fragmentos sintéticos facilitan a los investigadores la caracterización de los antisueros heterólogos que se utilizan concurrentemente en el ensayo inmunológico y para desarrollar antisueros específicos proyectados hacia la región terminal amínica de la hormona humana. Los antisueros basados en la secuencia humana permitirán llevar a cabo estudios más detallados sobre la naturaleza de la hormona circulante en el hombre y su papel en la homeostasis del calcio y en la enfermedad metabólica de los



huesos.

- La hormona sintética puede utilizarse, clínicamente, para la sustitución terapéutica por la hormona paratiroides humana natural. El péptido se administra en cantidades medidas
5. en microgramos mediante inyección intravenosa (IV) o intramuscular (IM). La dosificación efectiva depende de muchos factores incluyendo, pero sin limitación, la tolerancia del paciente, efectos secundarios y similares, no obstante puede determinarse rutinariamente por un entendido en el arte. El
 10. vehículo de la hormona será cualquier vehículo fisiológicamente tolerable que tenga un pH aproximadamente neutro, tal como la solución salina fisiológica. La hormona sintética puede utilizarse también en procedimientos de diagnóstico, tomando como base el hecho de que la hormona paratiroides produce hi-
 15. percalcemia, hipocalcemia, hiperfosfaturia y aumento de la AMP cíclica urinaria en individuos normales. En este procedimiento se evalúa la respuesta del paciente administrándole el péptido, ya sea por vía intravenosa o intramuscular, y vigilando el calcio en el suero, el calcio en la orina, el fosfato y la AMP cíclica.

20.

Síntesis

- Los péptidos basados en la secuencia humana se sintetizan según uno cualquiera de dos métodos conocidos. El primero es la técnica de síntesis en fase sólida de R.B. Merrifield y colaboradores expuesta en Advances in Enzymology 32, 221 (1969) y que constituye el objeto de la patente estadounidense nº 3.531.258 expedida el 29 de septiembre de 1970, cuyo objeto se cita aquí como referencia. El segundo es la síntesis clásica descrita por M. Bodanszky y M.A. Ondetti en Peptide
- 25.



Synthesis, Interscience (Nueva York 1966), cuyo objeto se cita aquí como referencia.

La síntesis de fase sólida

- El método de fase sólida para sintetizar una cadena
5. peptídica, según Merrifield y colaboradores, se basa en el hecho de que la cadena puede sintetizarse por etapas mientras que un extremo de la cadena se une de forma covalente a un soporte sólido insoluble. Durante las etapas sintéticas intermedias el péptido permanece en la fase sólida y, por consiguiente,
10. puede manipularse en forma conveniente sin que se produzcan pérdidas importantes.

- La automatización del procedimiento llevado a cabo con el aparato de Merrifield resulta posible debido a que todas las reacciones, incluyendo los procedimientos intermedios de purificación, se efectúan en un recipiente de reacción único. El aparato resuelve también el problema de introducir los reactivos y disolventes apropiados en el interior del recipiente con la secuencia apropiada y en el momento adecuado,
15. mientras que se mantiene la suficiente flexibilidad para abarcar una amplia gama de reacciones y condiciones que pueden producirse por la modificación de cada una de las reacciones en la
20. síntesis.

- Durante el procedimiento el soporte sólido es un botón de copolímero de estireno-divinilbenceno clorometilado. El aminoácido C-terminal se acopla como un éster bencílico a la
25. resina y, al mismo tiempo, la cadena peptídica desarrolla un residuo por condensación en el extremo amínico con aminoácidos N-acilados. Se ha elegido como grupo protector el grupo terciobutiloxicarbonílico y la activación se lleva a cabo, normalmen-



te, por medio de carbo-diirida o éster activo.

Por lo general, en el aparato de Merrifield y colaboradores, los reactivos y disolventes apropiados se eligen mediante las válvulas selectoras de disolvente y aminoácido y se transfieren, por medio de la bomba de medición, de uno de los recipientes al recipiente de reacción que contiene la resina peptídica. Después de transcurrido el período de mezcla deseado, por medio del sacudidor, se separan los disolventes, los reactivos en exceso y los subproductos por filtración de vacío, introduciéndose en el matraz de residuos. Se repiten las operaciones básicas en una secuencia predeterminada bajo control eléctrico hasta que se completa la síntesis del péptido deseado. Todas las partes del aparato que entran en contacto con los disolventes y reactivos son de vidrio o de materias poliméricas químicamente resistentes.

Antes de que pueda iniciarse la síntesis de un péptido son necesarias diversas operaciones preliminares. En primer lugar debe prepararse y analizarse la resina de soporte que contiene el aminoácido C-terminal de la cadena peptídica propuesta. Esto se lleva a cabo mediante la esterificación de un copolímero clorometilado de estireno y divinilbenceno con el aminoácido de tercibutiloxicarbonilo (t.-BOC). El producto se libera de partículas muy finas de resina por flotación en cloruro de metileno para impedir el atasco subsiguiente de los discos fritos del recipiente de reacción. Se hidroliza una muestra del producto secado al vacío en una mezcla 1:1 de dióxano y HCl 12 N y se mide cuantitativamente el aminoácido en un analizador de aminoácidos. El contenido de aminoácido se utiliza para calcular las cantidades de derivados de aminoácido



y de reactivo de dicitclohexilcarbodiimida que se utilizarán en la síntesis. La mejor gama de sustitución es de 0,1 a 0,3 mm por gramo. Las resinas de aminoácido de tercibutiloxicarbo-
nilo se preparan, normalmente, con anticipación y se almacenan hasta que se precisan.

Los depósitos de disolvente apropiado se llenan con ácido acético glacial, cloruro de metileno y etanol absoluto (99,5%) comercial. La N-N-dimetilformamida se libera de dimetilamina y ácido fórmico mediante sacudimiento con óxido de bario y destilación bajo presión reducida. La solución de HCl 1N-ácido acético se prepara adicionando 700 cc de ácido acético glacial al embudo separador de almacenado y haciendo pasar una lenta corriente de cloruro de hidrógeno anhidro. Se retiran muestras del fondo y se titulan por cloruro según el método Volhard. Esta solución, una vez protegida mediante el largo serpentín de tubo capilar y tubo de secado, es estable durante varias semanas sin que se produzca un descenso significativo de la concentración. El reactivo de trietilamina se prepara mezclando 50 cc de trietilamina con 450 cc de dimetilformamida purificada.

Se carga el recipiente de reacción con una cantidad pesada del aminoácido-resina de t-BOC (de 2 a 4 gramos para un pequeño recipiente de 45 cc de capacidad). Se lubrica el tapón con grasa de alto vacío de silicona y se fija en posición con resortes, uniéndose los conductos de entrada y de salida. En la síntesis se utilizan tres equivalentes de cada derivado de aminoácido de t.-BOC por equivalente del primer aminoácido de la resina. La cantidad calculada de cada uno de los seis primeros aminoácidos se disuelve en 7 cc de cloruro de metile-



- no, se filtra en caso necesario, y se dispone en los recipientes de aminoácido con la secuencia apropiada. La t.-BOC-nitro-L-arginina, debido a su pobre solubilidad en cloruro de metileno, se disuelve primero en 2 cc de dimetilformamida y se diluye
5. con 5 cc de cloruro de metileno, mientras que la t.BOC-im-bencil-L-histidina se disuelve en 7 cc de dimetilformamida pura. Los ésteres de t.-BOC aminoácido-p-nitrofenilo se disuelven en 16 cc de dimetilformamida pura. Durante la síntesis automatizada, se bombean por completo las soluciones de aminoácidos al recipiente
10. reaccional y, por consiguiente, no se requiere una concentración exacta. Por otra parte, se mide la solución de dicitclohexilcarbodiimida con la bomba de medición y debe calcularse para cada prueba de concentración del reactivo. Dado que se conoce el volumen de que se disponía y el volumen total bombeado puede calcularse el volumen actual de la solución de diimida vertida en
15. el recipiente. La cantidad requerida de dicitclohexilcarbodiimida se disuelve en este volumen de cloruro de metileno. El volumen total de solución preparada de una vez depende del número de aminoácidos que deban adicionarse.
20. En un ciclo diimídico típico, el instrumento lava primero la resina tres veces con ácido acético mediante tres bombes, sacudidas y etapas de salida. La bomba de medición se detiene siempre al término de la carrera de agotamiento para minimizar la mezcla de disolvente y el agitador siempre se detiene con el recipiente en la posición vertical para hacer posible la siguiente etapa de filtración (salida). Durante la tercera de estas etapas de salida, la válvula de disolvente adopta la posición 2 y luego se bombea en el recipiente el reactivo de HCl-ácido acético. El período de 30 minutos necesario para comple-
- 25.



tar la separación del grupo protector de tercibutiloxicarbonilo, se obtiene utilizando las tres etapas sucesivas de sacudimiento de 10 minutos.

- Después de esta etapa de desprotección, se lava la
5. resina tres veces con ácido acético para separar el cloruro de hidrógeno, tres veces con etanol para separar el ácido acético y tres veces con dimetilformamida. Un período de 10 minutos de agitación con trietilamina en dimetilformamida sirve para neutralizar el clorhidrato del aminoácido de la resina, liberando de este modo la amina libre en preparación para acoplarse con el próximo aminoácido protegido. El cloruro de trietila-
10. monio y la trietilamina en exceso se separan mediante tres lavados con dimetilformamida y se preparan las resinas para la etapa de acoplamiento. Luego se bombea la solución aminoácida de t.-BOC al recipiente durante una etapa de bombeo de 30 segundos. En la etapa siguiente (lavado), la bomba impulsa una o
15. mas emboladas de aire, siguiendo tres emboladas de cloruro de metileno para nivelar la línea de aminoácido.

- La etapa siguiente es una operación de agitación de
20. 10 minutos para permitir que el aminoácido se empape en los botones de resina. Durante esta etapa la válvula de disolvente avanza a la posición de la diimida. En la etapa siguiente se bombea durante 30 segundos la solución de diimida y luego de la etapa de lavado se adicionan una o mas emboladas de solución de diimida y tres emboladas de cloruro de metileno. A conti-
25. nuación se produce la reacción de acople durante un ciclo de agitación de 2 horas. Después de la reacción de acople se separan los subproductos y los reactivos en exceso mediante tres lavados con cloruro de metileno y dos lavados con etanol.



- En caso de que el interruptor de final de ciclo se disponga en la posición de retención, el instrumento se detiene después del tercer lavado con etanol y la resina queda suspendida en etanol. En caso de que el interruptor esté en
5. la posición de "marcha", el tambor vuelve al principio del ciclo y prosigue para llevar a cabo el ciclo siguiente de la operación. El aparato continuará funcionando durante 24 horas, aproximadamente, hasta que se complete el ciclo de acoplamiento para el sexto aminoácido. Luego, el microinterruptor de final
10. de funcionamiento detiene el aparato. Para continuar el funcionamiento se lavan los recipientes de aminoácido (se adicionan disolventes a los depósitos y se extraen a través de la válvula de aminoácido y de la válvula de disolvente introduciéndose en el matraz de residuos mediante la llave de
15. cierre de tres vías). Luego se vuelven a llenar los depósitos de aminoácidos con las nuevas soluciones apropiadas, rellenándose los depósitos de reactivo y de disolvente, en caso necesario. La válvula de aminoácido se fija mediante un interruptor en la posición 12. Luego se dispone de nuevo el tambor, manualmente, a la etapa 1 para iniciar el acoplamiento de los
20. seis residuos de aminoácidos siguientes.

Utilizando este aparato puede llevarse a cabo un ciclo de acoplamiento de éster activo en vez de un ciclo de diimida con el empleo de ciertos disolventes y reactivos distintos, variando el orden y el ajuste de los temporizadores.

25. Cuando se ha completado la síntesis de la secuencia de aminoácido deseada se separa la resina peptídica del recipiente de reacción con la ayuda de etanol, se filtra y se seca. La ganancia de peso de la resina durante la síntesis pro-



porciona una indicación de la cantidad de péptido incorporado. El péptido se disocia de la resina con ácido HBr-trifluoroacético y se somete a un procedimiento de purificación apropiado.

5. El péptido del presente invento se sintetizó según el método de fase sólida tal como se ha indicado anteriormente y descrito por Merrifield y colaboradores. El péptido se sintetizó en el sintetizador de péptidos Beckman, modelo 990. La resina utilizada fue en forma de botones de poliestireno clorometilado y reticulado al 1%. El acoplamiento de la resina se llevó a cabo utilizando aminoácido de tercibutiloxicarbonilo en presencia de dicitclohexilcarbodiimida en cloruro de metileno. La aminoácido-resina se desbloqueó con ácido trifluoroacético en cloruro de metileno y se neutralizó con trietilamina. Después de la adición del residuo 34^o a la cadena se separó el péptido de la resina con fluoruro de hidrógeno líquido.
- 10.
- 15.

En los dibujos y en toda esta descripción se utilizan abreviaturas corrientes de conformidad con la nomenclatura siguiente:

- 20.
- | | |
|---------|-----------------|
| Ser | Serina |
| Val | Valina |
| Glu | Acido glutámico |
| Ile | Isoleucina |
| Gln | Glutamina |
| 25. Leu | Leucina |
| Met | Metionina |
| His | Histidina |
| Gly | Glicina |



	Asn	Asparagina
	Lys	Lisina
	Arg	Arginina
	Trp	Triptófano
5.	Phe	Fenilalanina

Otras abreviaturas corresponden a:

	Boc	tercibutiloxicarbonilo
	Bpoc	2-(p-difenilil)-isopropiloxicarbonil-
	But	tercibutilo
10.	DCCI	diciclohexilcarbodiimida
	Hobt	1-hidroxi-benzotriazol
	Trt	Tritilo-
	Z	benziloxicarbonil-

La síntesis clásica

15. El péptido se sintetizó también utilizando el método clásico descrito por Bodansky y colaboradores. Los productos intermediarios III, IV, VI, VIII, X y XII se prepararon siguiendo métodos standards. Todos los productos intermediarios se designan en la Tabla I con los números III-XII.

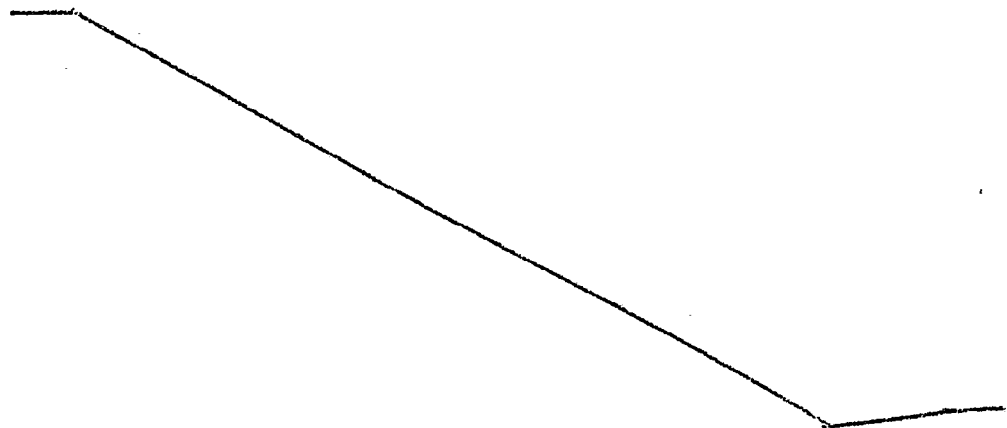




TABLA I

FORMULAS DE LOS PRODUCTOS INTERMEDIARIOS PROTEGIDOS III-XII

Secuencia nº	Fórmula
III 29-34	H-Gln-Leu-Val-His-Asn-phe-OBut
IV 25-28	$\begin{array}{ccccccc} & \text{H}^{\oplus} & \text{Boc} & \text{Boc} & \text{Boc} & & \\ & & & & & & \\ \text{Z} & -\text{Arg} & -\text{Lys} & -\text{Lys} & -\text{Lys} & -\text{O}^{\ominus} & \end{array}$
V 25-34	$\begin{array}{ccccccccccc} & \text{H}^{\oplus} & \text{Boc} & \text{Boc} & \text{Boc} & & & \text{H}^{\oplus} & & & \\ & & & & & & & & & & \\ \text{H}_2 & -\text{Arg} & -\text{Lys} & -\text{Lys} & -\text{Lys} & -\text{Gln} & -\text{Leu} & -\text{Val} & -\text{His} & -\text{Asn} & -\text{phe} & -\text{OBut} \cdot 3\text{Cl}^{\ominus} \end{array}$
VI 18-24	$\begin{array}{cccccccc} & & \text{OBut} & \text{H}^{\oplus} & & & & \\ & & & & & & & \\ \text{Bpoc} & -\text{Met} & -\text{Glu} & -\text{Arg} & -\text{Val} & -\text{Gln} & -\text{Trp} & -\text{Leu} & -\text{O}^{\ominus} \end{array}$
VII 18-34	$\begin{array}{ccccccccccc} & & \text{OBut} & \text{H}^{\oplus} & & & \text{H}^{\oplus} & \text{Boc} & \text{Boc} & \text{Boc} & \\ & & & & & & & & & & \\ \text{H}_2 & -\text{Met} & -\text{Glu} & -\text{Arg} & -\text{Val} & -\text{Gln} & -\text{Trp} & -\text{Leu} & -\text{Arg} & -\text{Lys} & -\text{Lys} & -\text{Lys} & -\text{Gln} & -\text{Leu} & -\text{Val} & -\text{His} & -\text{Asn} & -\text{phe} & -\text{OBut} & -4\text{Cl}^{\ominus} \end{array}$
VIII 13-17	$\begin{array}{ccccccc} & \text{Boc} & & & \text{But} & & \\ & & & & & & \\ \text{Bpoc} & -\text{Lys} & -\text{His} & -\text{Leu} & -\text{Asn} & -\text{Ser} & -\text{NHNH}_2 \end{array}$
IX 13-34	$\begin{array}{ccccccccccc} & \text{Boc} & \text{H}^{\oplus} & & \text{But} & \text{OBut} & \text{H}^{\oplus} & & & & \\ & & & & & & & & & & \\ \text{H}_2 & -\text{Lys} & -\text{His} & -\text{Leu} & -\text{Asn} & -\text{Ser} & -\text{Met} & -\text{Glu} & -\text{Arg} & -\text{Val} & -\text{Gln} & -\text{Trp} & -\text{Leu} & -\text{Arg} & -\text{Lys} & -\text{Lys} & -\text{Lys} & -\text{Gln} & -\text{Leu} & -\text{Val} & -\text{His} & -\text{Asn} & -\text{phe} & -\text{OBut} \cdot 5\text{Cl}^{\ominus} \end{array}$
X 4-12	$\begin{array}{cccccccc} & \text{OBut} & & & & & & \\ & & & & & & & \\ \text{Trt} & -\text{Glu} & -\text{Ile} & -\text{Gln} & -\text{Leu} & -\text{Met} & -\text{His} & -\text{Asn} & -\text{Leu} & -\text{Gly} & -\text{OH} \end{array}$



- tos III y IV por medio de DCCI-HOBT^{7/}. Se precipitó el producto bruto en acetonitrilo-agua y se cromatografió mediante cromatografía de capa delgada utilizando gel de sílice y un sistema disolvente de éster acético, piridina, ácido acético y agua
5. (62:21:6:11) (sistema 100), Rf (S= 0,32). Se separó el grupo Z mediante hidrogenación catalítica sobre carbón paladiado. Se adicionaron simultáneamente 3 equivalentes de HCl. Se obtuvo V en la forma de triclorhidrato.
10. Secuencia 18-34 (VIII). El acoplamiento de V con el fragmento 18-24 (VI) por medio de DCCI-HOBT proporcionó el derivado de Bpoc de VII. Este se purificó luego por medio de distribución a contracorriente en un sistema de metanol/acetato amónico acuoso 0,1 M (pH=7,0)/cloroformo/tetracloruro de carbono 10:4:7:3 (K=0,33), Rf(S)=0,16 en sistema 100. La separación
15. del grupo Bpoc por medio de HCl en trifluoroetanol proporcionó el tetraclorhidrato VII.
20. Secuencia 13-34 (IX). Se condensó VII con la azida, que se obtuvo de VIII^{8/} y luego se purificó. Se obtuvo así el derivado de Bpoc de IX por medio de distribución a contracorriente en el sistema ya descrito de metanol/acetato amónico/cloroformo/tetracloruro de carbono (K=0,65), Rf(S)=0,40 en un sistema de 2-butanol/ácido acético/agua (67:10:23) (sistema 96), = 0,30 en sistema 100. Se separó de nuevo el grupo Bpoc con HCl en trifluoroetanol y se obtuvo IX en forma de pentaclorhidrato, Rf(S)=0,23 (sistema 96).

25.

^{7/} König, W. & Geiger, R., Chem. Ber., 103, 788 (1970).

^{8/} Honzl, J. & Rudinger, J., Coll. Czechoslov. Chem. Commun., 26, 2333 (1961).



5. Secuencia protegida 1-32 (II). Se acopló XI, según Honzl y Rudinger ^{8/}, con la azida que se obtuvo de XII y el producto bruto en un sistema de metanol/acetato amónico acuoso 0,2 M (pH=4,75)/cloroformo/tetracloruro de carbono 10:3:8:4 (K=0,21); Rf(S)=0,43 en sistema 96; = 0,30 en sistema 100.

10. I. Hormona paratiroide humana libre. Se separaron los grupos protectores de II por medio de ácido clorhídrico concentrado (10 minutos a 0°C) y se adicionó el clorhidrato del péptido (I) al acetato a través de intercambio iónico. El péptido así obtenido solo contenía cantidades muy reducidas de subproductos, fundamentalmente una mezcla de un derivado de metionina-S-óxido.

15. Caracterización: Rf(C)=0,36 en un sistema de 1-butanol/piridina/ácido acético/agua, 38:20:5:24 (sistema 151); = 0,54 (sistema 54). Electroforesis de capa delgada en HCl en trifluoroetanol, pH=1,9, 90 minutos., 16 V/cm, trayectoria recorrida de 6 cm hacia el cátodo. Coeficiente de distribución K=0,12 (N-butanol/acetato amónico acuoso 0,2M (pH=4,75) /metanol 4:4:1).

20. Análisis de aminoácidos. (hidrólisis de 15 horas, 118°C, HCl 6N) Trp 0,51 (1) (el contenido de un residuo de Tro en F sin hidrolizar proporcionó un espectro de rayos ultravioleta de $\lambda_{max} = 280,228$ nm); Lys 3,85 (4), His 2,75 (3); Arg 1,88 (2); Asp 3,05 (3); Ser 2,47 (3); Glu 5,06 (5); Gly 1,07 (1); Val 3,16 (3); Met 1,96 (2), Ile 1,03 (1); Leu 4,75 (5); Phe (valor básico) 1,00.

Derivado de metionina-S-óxido:

a) mezcla de Met ⁸-y Met ¹⁸-mono-S-óxido (I en H₂O₂)



acuoso al 0,6%, 3 min., 25º) Rf(C)=0,29 en sistema 151; = 0,45 en un sistema de 1-butanol/piridina/ácido acético/agua, 38:24:8:30 (sistema 101);=0,48 en un sistema de 2-butanol/2-propanol/ácido cloroacético al 9%, 58:8:34:(v/v) (sistema 54).

- 5. b) Met^{8,18}-di-S-oxido (I en H₂O₂ acuoso al 0,6%, 45 min., 25º); Rf(C)=0,21 en sistema 151; = 0,39 en sistema 100; = 0,43 en sistema 54.

Actividad biológica. I mostró en la tireo-paratiroidesactomía de la rata, dos horas después de inyección intravenosa, en dosis de 100 y 500 microgramos, un claro aumento de la concentración de calcio en el suero.

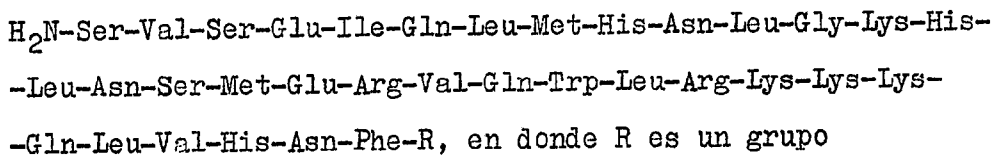
10.

= . =

N O T A

- 15. Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente estadounidense serial nº 317.702 del 21-12-72 y continuación en parte nº 423.303 del 10-12-73.

- 20. 1.- Procedimiento para la preparación de un péptido biológicamente activo de la hormona paratiroides humana representados por:



- 25. carboxílico, y en cuya fórmula las abreviaturas tienen el significado:

Ser: Serina
 Val: Valina
 Glu: Acido glutamico

ME



- Ile: Isoleucina
Glu: Glutamina
Leu: Leucina
Met: Metionina
5. His: Histidina
Asn: Asparragnina
Gly: Glicina
Lys: Lisina
Arg: Arginina
10. Phe: Fenilalanina, y
Trp: Triptófano,

caracterizado porque comprende unir de forma covalente la Phe N-protegida a un soporte sólido insoluble, desprotegiendo dicho Phe; condensar Asn N-protegida con dicha Phe, desprotegiendo

15. dicha Asn; condensar sucesivamente cada uno de los aminoácidos individuales N-protegidos correspondientes a los residuos de dicho péptido para formar, de este modo el péptido asociado al soporte y separar dicho péptido de dicho soporte.

20. 2.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho soporte está formado por botones de poliestireno clorometilado y reticulado al 1% y porque se separa dicho péptido de dicho soporte mediante fluoruro de hidrógeno líquido.

25. 3.- Procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque dicha etapa de condensación se lleva a cabo en presencia de dicitclohexilcarbodiimida en cloruro de metileno; el grupo N-protector

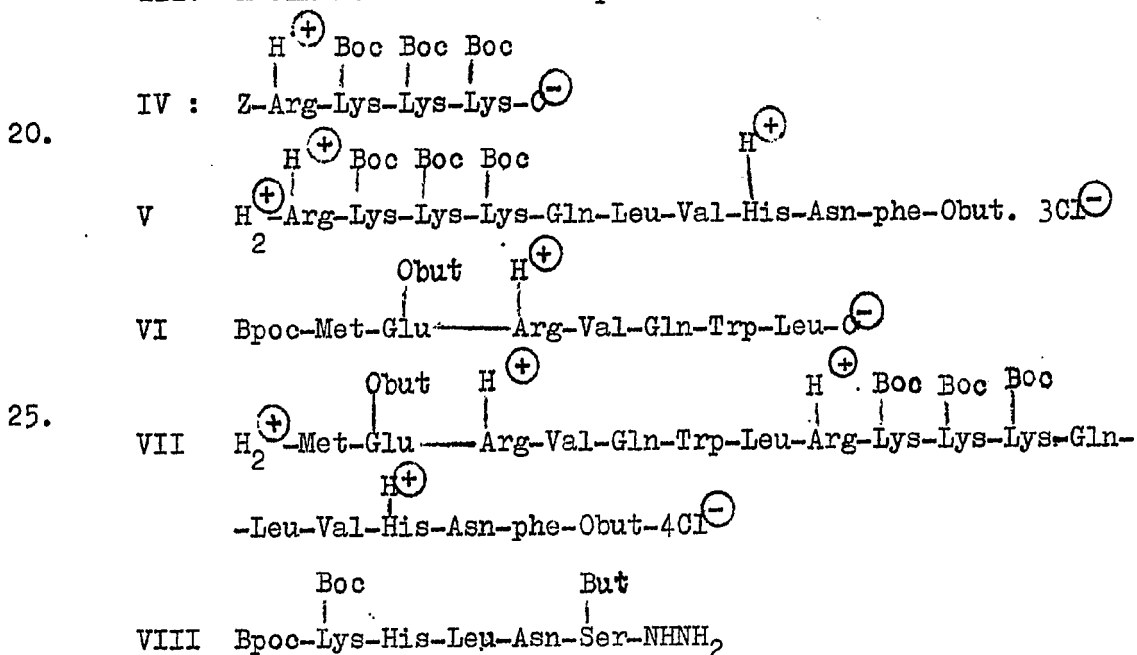
mg



es tercibutiloxicarboxilo y dichas etapas de desprotección se llevan a cabo con el empleo de ácido trifluoroacético en cloruro de metileno.

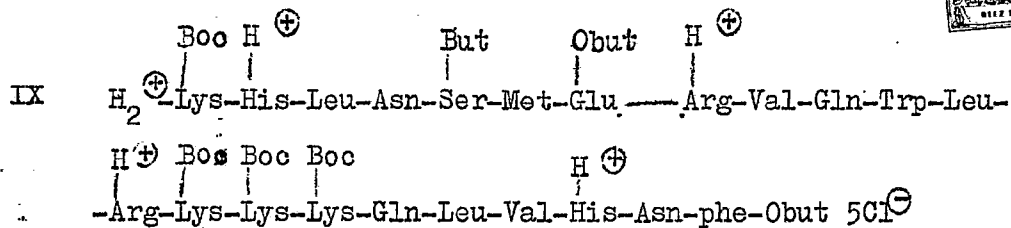
- 4.- Procedimiento, de conformidad, con la reivindicación 1, que en una variante del mismo, comprende preparar el intermediario V condensando los intermediarios III y IV, preparar el intermediario VII condensando los intermediarios V y VI; preparar el intermediario IX condensando los intermediarios VII y VIII; preparar el intermediario XI condensando los intermediarios IX y X, preparar el intermediario II condensando los intermediarios XI y XII, cuyos intermediarios tienen el significado indicado en la Tabla I, y separar los grupos protectores del intermediario II para formar de este modo dicho péptido, cada uno de cuyos intermediarios citados representan respectivamente las siguientes formulaciones:

III: H-Gln-Leu-Val-His-Asn-phe-Obut

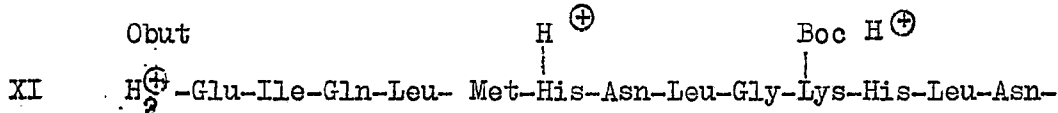
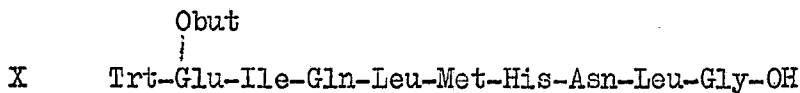


mke

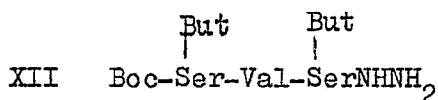
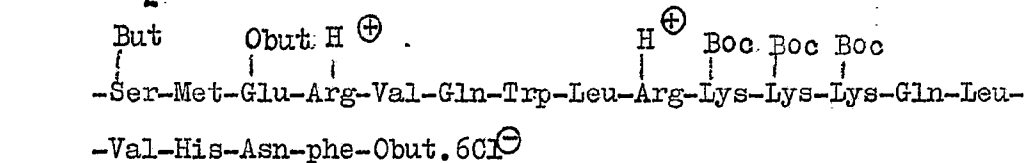
20 Dic



5.



10.



15. en las que las abreviaturas tienen el mismo significado dado en la reivindicación 1, y los restantes representan respectivamente:

But: t-butilo ,

Boc: t-butiloxicarbonilo,

20.

Bpoc: 2-(p-bifenilil)-isopropiloxicarbonilo,

Trt: tritilo

y

Z: benciloxicarbonilo.

5.- Procedimiento para la preparación de un péptido biológicamente activo de la hormona paratiroides humana.

25.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva compuesta de 26 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 20 de Diciembre 1973.

p.a.

JAIMÉ ISERN

P. P.

Firmado: FELIPE PRIETO

mge

421641

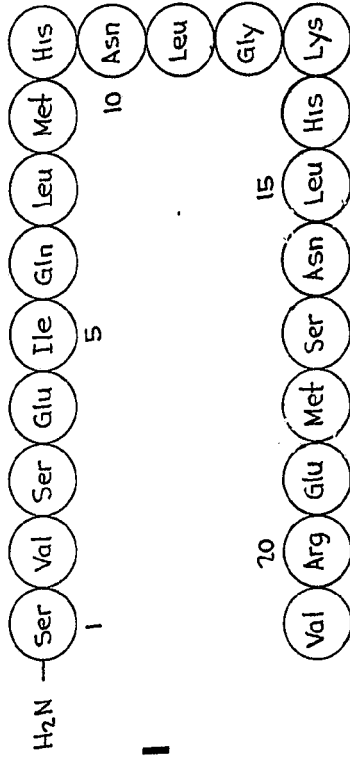
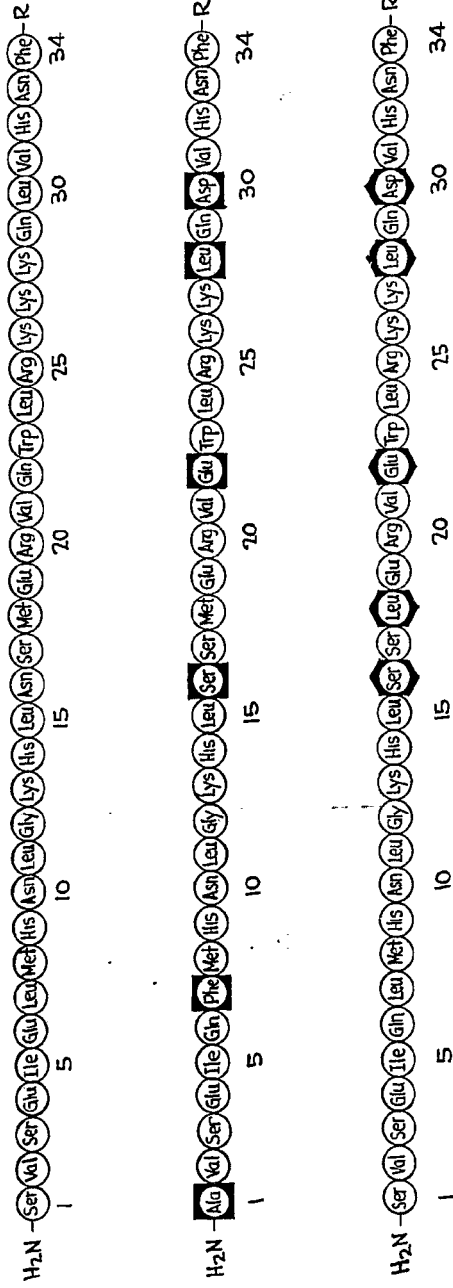


FIG. 1

FIG. 2



Madrid, a 20 DIC. 1973.

P.O. JAIME ISERN
P. P.

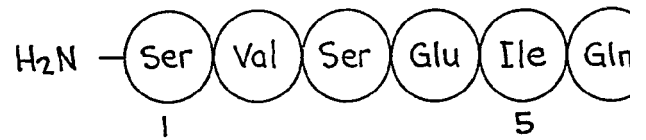


FIG. 1

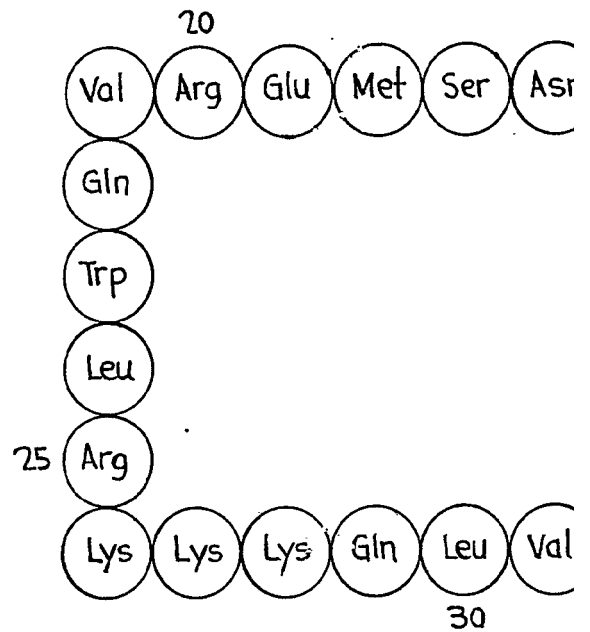
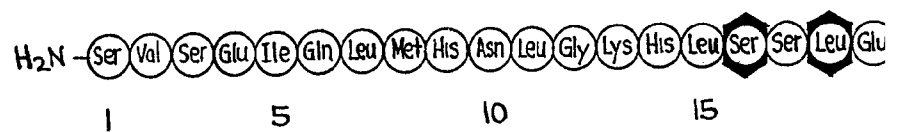
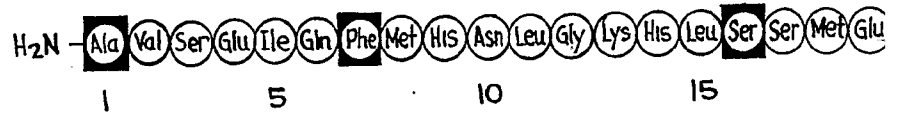
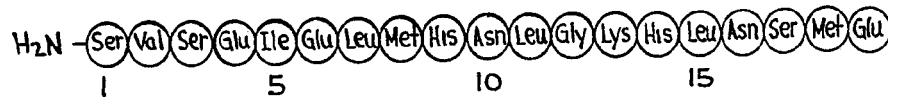
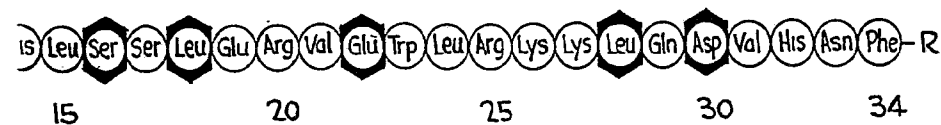
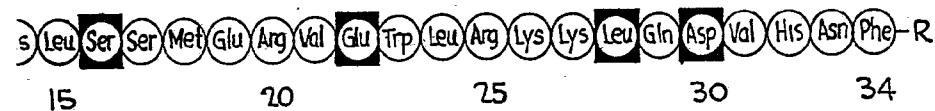
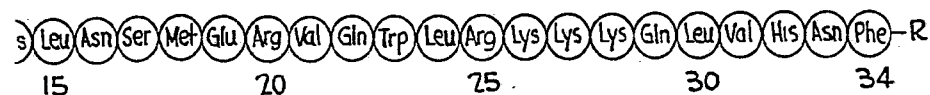
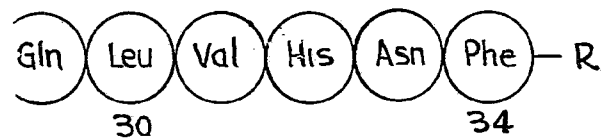
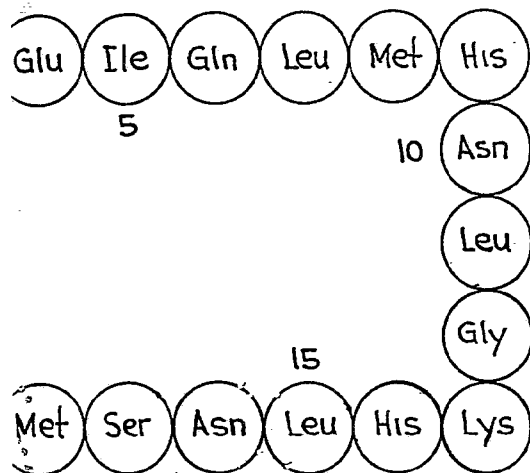


FIG. 2



421641



Madrid, a 20 DIC. 1973.

p.o. JAIME ISERN
P. P.

[Handwritten signature]