



ESPAÑA

15 FEB. 1977

PATENTE DE INVENCION

(11) NUMERO	440.214
(21) FECHA DE PRESENTACION	12-8-75

(10) A 1

(30) PRIORIDADES:	(32) FECHA	(33) PAIS
(31) NUMERO	12-8-74	Estados Unidos
496.539		

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL	(62) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	AGIK	

(64) TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO DE SINTESIS DE CALCITONINA DE SALMON

(71) SOLICITANTE (S)

ARMOUR PHARMACEUTICAL COMPANY

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

Greyhound Tower, PHOENIX, Arizona 85077 Estados Unidos

(72) INVENTOR (ES)

John Lawrence Hughes; Jay Kenneth Seyler; Robert Chung-Huan Liu
todos de nacionalidad estadounidense

(73) TITULAR (ES)

(74) REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1

RESUMEN DE LA INVENCION

5

Se describen péptidos resinosos útiles en la preparación de calcitonina de salmón junto con procedimientos para su obtención. La invención también abarca los péptidos de los que se ha escindido la porción resina y que son útiles en la síntesis de la calcitonina de salmón, junto con procedimientos para la preparación de los péptidos escindidos. En general, los procesos implican una síntesis en fase sólida.

10

La invención trata de nuevos compuestos que contienen una cadena aminoácida similar a la de la calcitonina de salmón y de nuevos métodos para cerrar la estructura cíclica en dichos compuestos y producir calcitonina.

COMPENDIO DE LA INVENCION

15

Esta invención se refiere a la hormona calcitonina y a sustancias que presentan una actividad biológica similar a la de la calcitonina y a sustancias que pueden ser convertidas en estas sustancias biológicamente activas. La invención trata también de los procedimientos para la preparación de estas sustancias.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

25

30

Es sabido que las sustancias biológicas de origen natural pueden ser obtenidas de las glándulas de los animales terrestres y acuáticos y que estas sustancias pueden ser utilizadas para tratar las deficiencias hormonales en el hombre y en otros animales. Entre estas sustancias se encuentra la hormona calcitonina. Se ha encontrado que esta hormona es especialmente útil en el tratamiento de la enfermedad de Paget (véase el artículo de DeRose y colaboradores, titulado "Treatment of Paget Disease with Calcitonin" en Seminars in Drug Treatment, Vol. 2, nº 1 (verano 1972)).

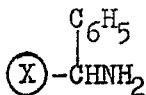
1 la actividad hormonal de la calcitonina. Por lo tanto, hemos
tratado de descubrir estos métodos y sustancias.

5 Aunque la síntesis de la calcitonina del salmón uti-
lizando la síntesis clásica de péptidos ya ha sido publicada
(Guttmann, S. y colaboradores, Helv. Chim. Acta 52, 1789-1795
(1969)), se han e s t a d o buscando procedimientos que fue-
ran más prácticos para la producción a escala comercial ma-
yor. Aunque se conocen métodos para la síntesis de ciertos
péptidos, por adición singular de aminoácidos (Merrifield,
10 R.B., J.Am. Chem. Soc., 85, 2149-54 (1963) y Pietta, P.S.
y Marshall, G.R., Chem. Commun., 650 (1970)), todavía no se
ha publicado la síntesis de la calcitonina de salmón mediante
este tipo de adición.

DESCRIPCION DEL INVENTO

15 En general, utilizamos un tipo de síntesis en fase
sólida y partimos de una resina denominada resina de benzohi-
drilamina (resina BHA). Esta resina deriva de una resina en
perlas de poliestireno reticulado manufacturada por copoli-
merización de estireno y divinilbenceno. La resina de este
20 tipo es conocida y su preparación han sido descrita por
Pietta y colaboradores (Pietta, P.S. y Marshall, G.R., Chem.
Commun., 650 (1970)). Esta resina BHA de poliestireno reti-
culado se puede adquirir en los almacenes de productos quí-
micos. Hemos utilizado la denominación

25



para representar la resina BHA, en donde $\textcircled{\text{X}}$ es la porción de
poliestireno de la resina.

Síntesis de resinas-péptidos

30

En esta síntesis, los aminoácidos se adicionan uno

1 por uno a la resina insoluble hasta que se ha construido so-
bre la resina la secuencia total del péptido. Los grupos fun-
cionales de los aminoácidos están protegidos por grupos de
bloqueo. El grupo α -amino de los aminoácidos está protegido
5 por un grupo terc-butiloxicarbonilo o un equivalente del mis-
mo. Este grupo α -terc-butiloxicarbonilo será denominado BOC.
Las funciones hidroxilo de la serina y de la treonina están
protegidas con un grupo bencílico o derivado del bencilo tal
como 4-metoxibencilo, 4-metilbencilo, 3,4-dimetilbencilo,
10 4-clorobencilo, 2,6-diclorobencilo, 4-nitrobencilo, benzohidri-
lo o un equivalente del mismo. Empleamos el término BZ para
representar el grupo bencilo o derivado del bencilo. La fun-
ción hidroxilo de la tirosina puede estar sin proteger, pue-
de estar protegida por un grupo bencilo o derivado del ben-
15 cilo como se ha descrito, tal como un grupo BZ o puede estar
protegida por un grupo benciloxicarbonilo o derivado del ben-
cilocarbonilo tal como 2-clorobenciloxicarbonilo o 2-bromo-
benciloxicarbonilo o un grupo equivalente. Utilizamos el tér-
mino W para representar o bien un grupo no protector, un gru-
20 po BZ, un grupo benciloxicarbonilo o un grupo derivado del
benciloxicarbonilo. La función tiol de la cisteína puede es-
tar protegida por grupos protectores bencílicos o derivados
del bencilo, como los descritos anteriormente y denominados
BZ, o por un grupo n-alquiltio como metiltio, etiltio, n-propil-
25 tio, n-butiltio o sus equivalentes. Utilizamos la letra R
para representar los grupos n-alquiltio o los grupos BZ sobre
la cisteína. La función guanidino de la arginina puede estar
protegida con un grupo nitro, un grupo tosilo o un equiva-
lente del mismo. Empleamos la letra T para representar un
30 grupo nitro o un grupo tosilo. La función ϵ -amino de la

1 lisina puede estar protegida por un grupo benciloxycarbonilo
o un derivado del benciloxycarbonilo tal como 2-clorobencil-
oxycarbonilo, 2-bromobenciloxycarbonilo, 3,4-dimetilbencil-
oxycarbonilo o equivalentes de los mismos. Utilizamos la le-
5 tra V para representar el grupo benciloxycarbonilo o un deri-
vado del benciloxycarbonilo. Los grupos protectores utiliza-
dos sobre el nitrógeno imidazólico de la histidina son el
grupo benciloxycarbonilo y los derivados benciloxycarbonílicos
descritos anteriormente para la lisina y son denominados V.
10 El grupo ácido γ -carboxílico del ácido glutámico está pro-
tegido por un grupo bencilo o derivado del bencilo como se ha
descrito antes para la protección de la función hidroxilo
de la serina y la treonina. Estos grupos protectores están
representados por las letras BZ.

15 Como puede observarse en la fórmula de la calcitona
del salmón dada anteriormente, contiene 32 aminoácidos
y en esta fórmula las posiciones están numeradas de acuerdo
con la costumbre aceptada, comenzando en la posición 1 para
la CYS en un extremo de la cadena y terminando con la PRO
20 en la posición 32 en el otro extremo de la cadena. Para mayor
claridad de descripción, se seguirá este mismo sistema de nu-
meración al referirnos a los ciclos de la síntesis. El sis-
tema de aminoácidos comienza con el ciclo 32 que implica la
copulación de prolina y continúa con el ciclo 31 que implica
25 la copulación de treonina, etc.

Las sustancias reaccionantes aminoácidas preferidas
para uso en cada uno de los 32 ciclos de la síntesis se en-
cuentran en la siguiente Tabla I:

TABLA I

	<u>Número</u>	<u>Aminoácido reaccionante</u>
1	32	BOC-L-prolina
	31	BOC-O-bencil-L-treonina
5	30	BOC-glicina
	29	BOC-O-bencil-L-serina
	28	BOC-glicina
	27	BOC-O-bencil-L-treonina
	26	éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina
10	25	BOC-O-bencil-L-treonina
	24	BOC- Ω -nitro-L-arginina o BOC- Ω -tosil-L-arginina
	23	BOC-L-prolina
	22	BOC-O-bencil-L-tirosina, BOC-L-tirosina o BOC-O-2-bromobenciloxycarbonil-L-tirosina
15	21	BOC-O-bencil-L-treonina
	20	éster p-nitrofenílico de BOC-L-glutamina
	19	BOC-L-leucina
	18	BOC- ϵ -CBZ-L-lisina o BOC- ϵ -2-clorobenciloxycarbonil-L-lisina
20	17	BOC-N(im)-CBZ-L-histidina
	16	BOC-L-leucina
	15	éster γ -bencílico del ácido BOC-L-glutámico
	14	éster p-nitrofenílico de BOC-L-glutamina
	13	BOC-L-bencil-L-serina
25	12	BOC-L-leucina
	11	BOC- ϵ -CBZ-L-lisina o BOC- ϵ -2-clorobenciloxycarbonil-L-lisina
	10	BOC-glicina
30	9	BOC-L-leucina

1

TABLA I (continuación)

<u>Número</u>	<u>Aminoácido reaccionante</u>
8	BOC-L-valina
7	BOC-S-etiltio-L-cisteína, BOC-S-metiltio-L-cisteína,
5	BOC-S-n-propiltio-L-cisteína o BOC-S-n-butiltio-L-cisteína,
6	BOC-O-bencil-L-treonina
5	BOC-O-bencil-L-serina
4	BOC-L-leucina
10	éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina
2	BOC-O-bencil-L-serina
1	BOC-S-p-metoxibencil-L-cisteína, BOC-S-bencil-L-cisteína o BOC-S-3,4-dimetilbencil-L-cisteína.

15

Todos los derivados de aminoácidos mencionados en la Tabla I pueden ser adquiridos comercialmente a excepción quizá del derivado mencionado para uso en el ciclo nº 7. Estos materiales útiles en el ciclo 7 pueden ser preparados de acuerdo con el método descrito en la bibliografía (U. Weber y P. Hartter, Hoppe-Seyler, Z. Physiol. Chem. 351, 1384-8 (1970)).

20

Ciclo 32

Copulación de prolina a la resina BHA

25

La vasija de reacción utilizada en todas las etapas de todas las síntesis de resinas-peptidos puede ser una vasija de vidrio equipada con orificios de entrada en la parte superior para la adición de materiales y un disco de vidrio sinterizado en el fondo para separar las mezclas de reacción solubles y los disolventes de lavado por filtración. La filtración puede realizarse a vacío o empleando presión de nitrógeno. El contenido de la vasija puede ser agitado sacu-

30

1 diendo toda la vasija o mediante un agitador mecánico.

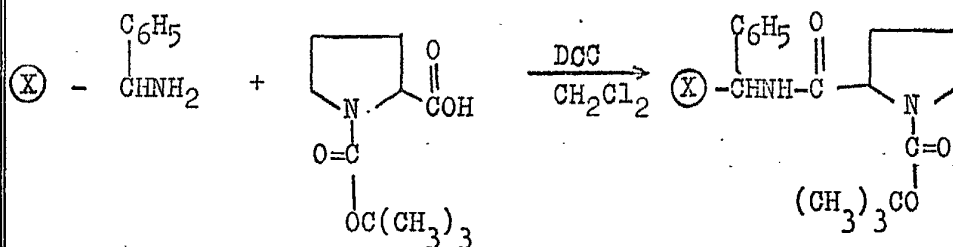
5 En el ciclo 32, la resina BHA se introduce en la va-
sija de reacción y se suspende en un disolvente como cloruro
de metileno, cloroformo, dimetilformamida, benceno o sus
equivalentes, en proporciones de 3 a 12 ml de disolvente por
gramo de resina. A esta mezcla se añade BOC-L-prolina en una
proporción de 1 a 6 equivalentes por equivalente de amina
10 libre de la resina BHA empleada. Después de un periodo de
mezcla de 5 a 10 minutos, se añade un reactivo de copulación
(CA) como la dicitclohexilcarbodiimida (DCC). Pueden utilizar-
se otros agentes copulantes a base de diimidias. El agente co-
pulante de diimida se utiliza en la proporción de 0,5 a 2,0
equivalentes por equivalente de BOC-L-prolina utilizada.

15 La BOC-L-prolina puede ser copulada en ausencia de
un reactivo copulante si se emplea su derivado éster activo,
su derivado azida, su derivado anhídrido simétrico o un de-
rivado anhídrido mixto adecuadamente seleccionado. Los deri-
vados éster activo que pueden ser empleados son el éster
20 2-nitrofenílico, el éster 4-nitrofenílico, el éster penta-
fluorfenílico, el éster de N-hidroxisuccinimida o sus equi-
valentes. Los ésteres activos se utilizan en proporciones
de 1 a 10 equivalentes por equivalente de amina libre de la
resina BHA.

25 La mezcla de reacción constituida por la resina BHA,
el disolvente, la BOC-L-prolina y el reactivo copulante o el
éster activo de BOC-L-prolina se agita o se sacude mecánica-
mente hasta que la reacción es completa, como indica el en-
sayo de ninhidrina (E. Kaiser y colaboradores, Anal. Biochem.
30 34, 595-8 (1970)) sobre una muestra de ensayo. Una vez com-
pletada la reacción de copulación, la resina BOC-L-prolina

1 puede ser lavada con disolventes como cloruro de metileno,
cloroformo, alcohol metílico, benceno, dimetilformamida o
ácido acético. La cantidad de disolvente de lavado puede ser
5 adecuadamente de 2 a 20 ml de disolvente por cada gramo de
resina BHA utilizada inicialmente. Si se desea terminar la
reacción de copulación antes de que sea completa, se utiliza
el proceso de lavado y los grupos amino libres residuales so-
bre la resina -BOC-L-prolina pueden ser bloqueados para evi-
10 tar que continúen reaccionando, mediante acetilación con un
exceso de reactivos acetilantes. El proceso de acetilación
se lleva a cabo agitando la resina-BOC-L-prolina con una so-
lución del reactivo de acetilación durante un periodo de 0,5 a
12 horas. Pueden utilizarse reactivos de acetilación como
15 N-acetilimidazol en solución en cloruro de metileno o una
mezcla de anhídrido acético y trietilamina en cloroformo. El
reactivo de acetilación puede ser utilizado en la proporción
de 0,5 a 5,0 equivalentes por equivalente de amina libre ti-
tulada en la resina BHA de partida.

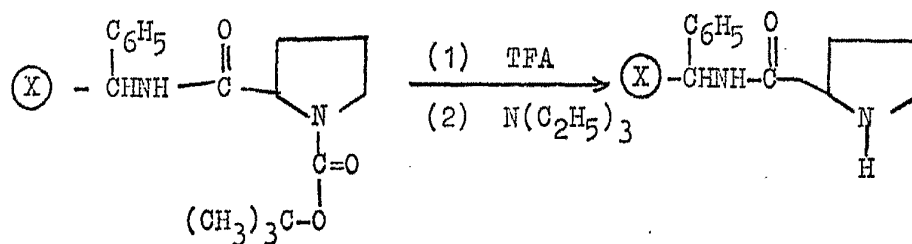
20 La reacción de copulación para producir la resina-
BOC-L-prolina puede ser descrita por la siguiente ecuación:



Desprotección de la resina-BOC-L-prolina

30 La resina BOC-L-prolina producida en la forma des-
crita puede ser lavada con un disolvente, como ya se ha di-
cho, y desprotegida agitándola con un agente tal como una mez-

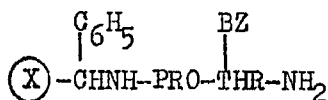
1 cla de ácido trifluoracético (TFA) en un disolvente como clo-
ruro de metileno, cloroformo, benceno o sus equivalentes. La
cantidad de TFA en el disolvente puede variar del 10 al 100%
5 de la mezcla. La cantidad de mezcla TFA-disolvente puede va-
riar entre 3 y 20 ml por gramo de resina BHA utilizada ini-
cialmente. El tiempo de reacción puede ser de unos 10 minu-
tos a 4 horas. La operación de desprotección se termina fil-
trando para separar la mezcla de TFA-disolvente. El TFA re-
sidual puede ser separado de la resina-L-prolina lavando con
10 3 a 20 ml por gramo de resina BHA de una solución de 5 a 30%
de trietilamina en un disolvente como cloruro de metileno,
cloroformo, benceno o sus equivalentes. Pueden utilizarse
otras aminas orgánicas terciarias o secundarias en lugar de
la trietilamina, tales como trimetilamina, N-etilpiperidina,
15 di-isopropilamina o sus equivalentes. El título de la amina
libre de la resina-L-prolina puede ser determinado por el
procedimiento de valoración de Dorman (Dorman, I.C., Tetrahe-
dron Letters, 1969, 2319-21). La reacción de desprotección
puede ser descrita por la siguiente fórmula:



Ciclo 31

30 La prolil-resina BHA obtenida como resultado del ci-
clo 32 puede ser suspendida en un disolvente copulante, aña-
dido el derivado de BOC-O-BZ-L-treonina y equilibrada la

1

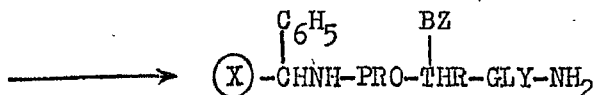
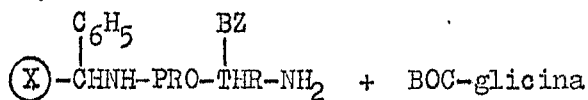


Ciclo 30

5

En el ciclo 30, la reacción de copulación y también la reacción de desprotección pueden ser realizadas en la misma forma que en el ciclo 31, a excepción de que se utiliza BOC-glicina en lugar de BOC-O-BZ-L-treonina. La reacción de copulación y desprotección puede escribirse así:

10



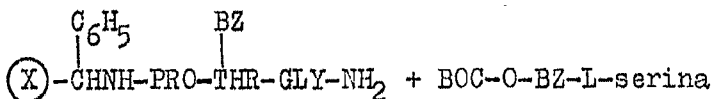
15

Este compuesto, que nosotros sepamos, nunca ha sido citado y más tarde se demostrará que puede convertirse en calcitonina de salmón.

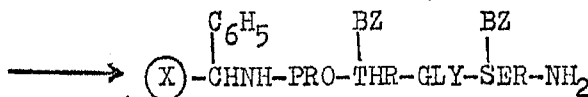
Ciclo 29

20

En el ciclo 29, las reacciones de copulación y desprotección pueden realizarse de la misma forma que en el ciclo 31, a excepción de que se emplea BOC-O-BZ-L-serina como derivado de aminoácido. Esta ecuación puede escribirse así:



25

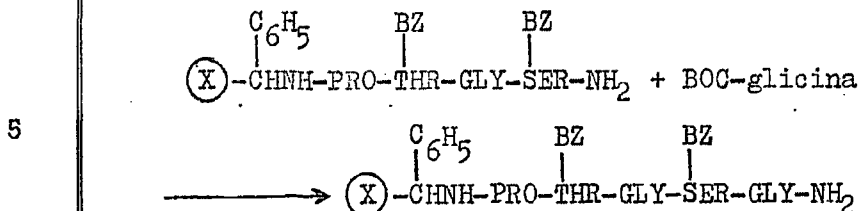


Ciclo 28

30

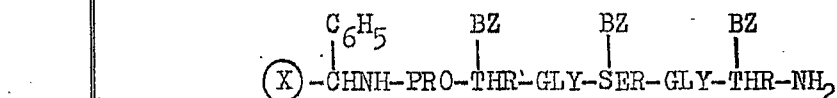
En el ciclo 28, las reacciones de copulación y desprotección se efectúan como se ha descrito en el ciclo 31, a excepción de que se emplea BOC-glicina como aminoácido

1 reaccionante. Estas reacciones de copulación y desprotección pueden escribirse así:



Ciclo 27

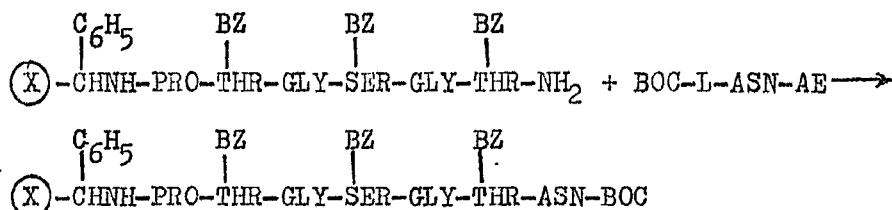
10 En este ciclo, las reacciones de copulación y desprotección pueden ser iguales a las del ciclo 31, empleando el mismo aminoácido reaccionante, dando lugar al siguiente compuesto:



Ciclo 26

20 En el ciclo 26, la reacción de copulación se lleva a cabo utilizando un derivado éster activo de BOC-L-asparagina. Se emplea el proceso con éster activo en lugar del método de copulación DCC para evitar una conocida reacción secundaria que se produce cuando se utiliza el agente copulante DCC con BOC-asparagina o BOC-glutamina. La reacción se lleva a cabo empleando el derivado éster activo de BOC-L-asparagina en la proporción de 2 a 10 equivalentes por equivalente de amina libre de la resina BHA en dimetilformamida, mezclas de dimetilformamida con benceno, cloruro de metileno
25 o cloroformo o con equivalentes de los mismos, en proporciones de 2 a 20 ml de disolvente por gramo de resina BHA utilizada inicialmente. Los tiempos de reacción son de 1 a 72 horas. La mezcla de reacción se separa de la resina BOC-péptido por filtración después de completada la reacción, como in-
30

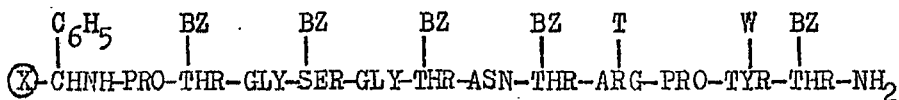
1 dica el ensayo con ninhidrina. Los derivados ésteres activos
 5 empleados pueden ser ésteres 2-nitrofenílicos, ésteres 4-ni-
 trofenílicos, ésteres pentafluorfenílicos o sus equivalentes.
 Utilizamos las letras AE para designar la porción éster acti-
 vo del derivado. La reacción de copulación puede escribirse
 así:



10 La reacción de desprotección para separar el grupo
 BOC se lleva a cabo como en el ciclo 32.

Ciclos 25-21

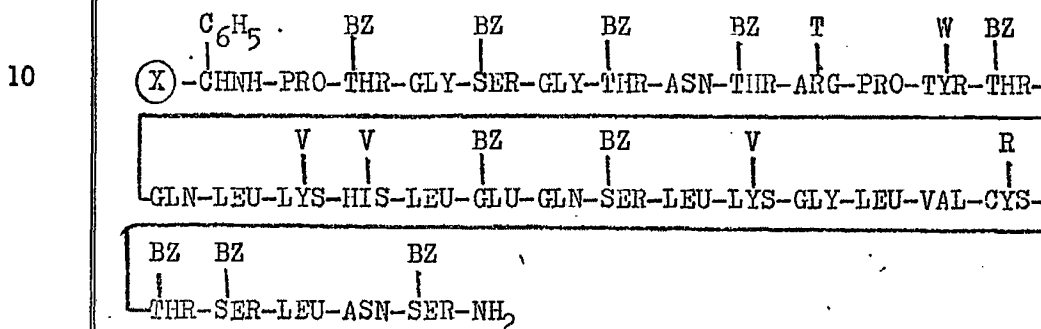
15 En cada uno de los ciclos 25 a 21, las reacciones de
 copulación y desprotección pueden efectuarse utilizando los
 métodos y las proporciones de sustancias reaccionantes del
 ciclo 31, empleando BOC-BZ-L-treonina en el ciclo 25, BOC-w-
 T-L-arginina en el ciclo 24, BOC-L-prolina en el ciclo 23,
 20 BOC-W-L-tirosina en el ciclo 22 y BOC-O-BZ-L-treonina en el
 ciclo 21. El compuesto resultante una vez completado el ci-
 clo 21 puede escribirse así:



Ciclo 20

25 En el ciclo 20, las reacciones de copulación y des-
 protección pueden ser llevadas a cabo utilizando los métodos
 y las proporciones de sustancias reaccionantes del ciclo 26,
 empleando el derivado éster activo de BOC-L-glutamina como
 derivado de aminoácido, dando lugar al siguiente compuesto:
 30

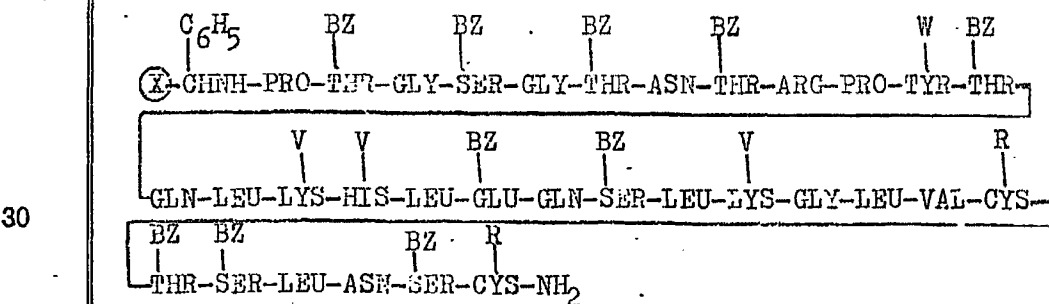
1 do del aminoácido en el ciclo 6, BOC-BZ-L-serina como deri-
 vado del aminoácido en el ciclo 5 y BOC-L-leucina en el ci-
 clo 4 como derivado del aminoácido. El ciclo 3 puede efectuar-
 se de forma idéntica al ciclo 26 utilizando el éster activo
 5 de BOC-L-asparagina. En el ciclo 2, los procedimientos pue-
 den ser iguales que en el ciclo 31, utilizando BOC-O-BZ-L-
 serina como derivado del aminoácido. El compuesto resultante
 del ciclo 2 es:



15

Ciclo 1

Este ciclo puede realizarse de forma idéntica al
 ciclo 7, utilizando derivados de BOC-S-R-L-cisteína. El gru-
 po R seleccionado para la cisteína puede ser el mismo utili-
 zado en el ciclo 7 o diferente. Por ejemplo, si el derivado
 20 seleccionado para el ciclo 7 es la BOC-S-etiltio-L-cisteína,
 el derivado en el ciclo 1 puede ser BOC-S-4-metoxibencil-L-
 cisteína o si se elige BOC-S-4-metoxibencil-L-cisteína para
 el ciclo 7, entonces este derivado también puede ser utiliza-
 do en el ciclo 1. Los compuestos resultantes del ciclo 1 es-
 25 tán descritos por la fórmula:



1 El ciclo 1 representa la terminación de la resina-
péptido calcitonina de salmón. La resina-péptido puede ser
sacada de la vasija de reacción y secada a vacío. El peso de
5 la resina-péptido puede esperarse que sea de 2,0 a 3,5 veces
el peso de la resina BHA utilizada inicialmente en la síntesis.

Escisión de la resina-péptido

10 El péptido se escinde de la resina-péptido resul-
tante del ciclo 1 por tratamiento con fluoruro de hidrógeno
líquido (HF). La reacción de escisión con HF puede llevarse
a cabo tratando una mezcla de la resina-péptido y anisol
(0,5 a 5 ml por cada gramo de resina-péptido) con HF líquido
(2 a 20 ml por cada gramo de resina-péptido), durante 0,5 a
15 20 horas, entre -20 y +15°C. Después del periodo de reacción,
el exceso de HF puede ser separado por evaporación y la mez-
cla resultante de péptido y perlas de resina puede ser ex-
traída con un disolvente orgánico como acetato de etilo,
éter dietílico, benceno o similares, para separar el anisol
y el HF residual. El péptido puede separarse de las perlas
20 de resina por extracción en ácido acético acuoso. En este mo-
mento, el péptido no es calcitonina de salmón cíclica sino
que se trata del producto no cíclico sin el enlace de disul-
furo cíclico entre las cisteínas de las posiciones 1 y 7 de
la molécula.

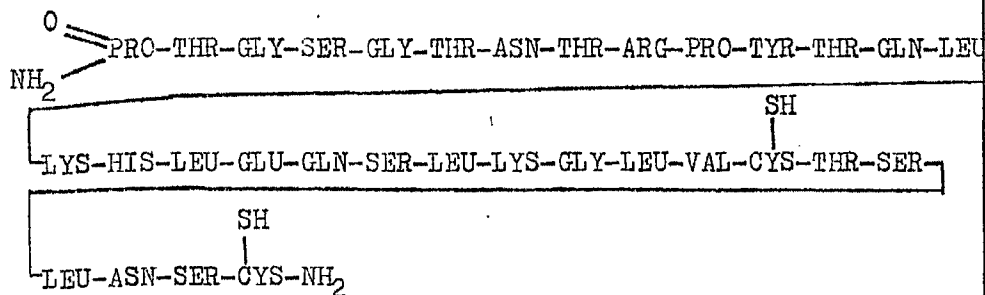
25 El tratamiento con HF elimina todos los grupos de
bloqueo del péptido excepto en los materiales que fueron pre-
parados utilizando los grupos de bloqueo S-alquiltio sobre
las funciones tiol de los restos de cisteína en las posicio-
nes 7 ó 1. El resto de S-n-alquiltio-L-cisteína es estable a
30 la escisión por HF y permanece intacto durante todo el pro-

1 caso de escisión y extracción. El resto de S-BZ-L-cisteína
es escindido por el HF para dar un resto de cisteína con una
función tiol libre. Ambos tipos de grupos de bloqueo han sido
empleados durante nuestra síntesis, ya sea solos o en combi-
5 nación de uno con otro, en las posiciones 7 y 1. Por lo tan-
to, los péptidos obtenidos después de la escisión con HF pue-
den ser de diversos tipos, según los grupos de bloqueo selec-
cionados para la función tiol del derivado de cisteína utili-
zado durante la síntesis de resina-péptido.

10 Si se emplean derivados de BOC-S-BZ-L-cisteína en
los ciclos 7 y 1 de la síntesis de resina-péptido, el pépti-
do resultante después de la escisión con HF será del Tipo I
y contendrá funciones tiol libres en ambos restos de cisteí-
na. El péptido sería representado por la fórmula:

15

Tipo I

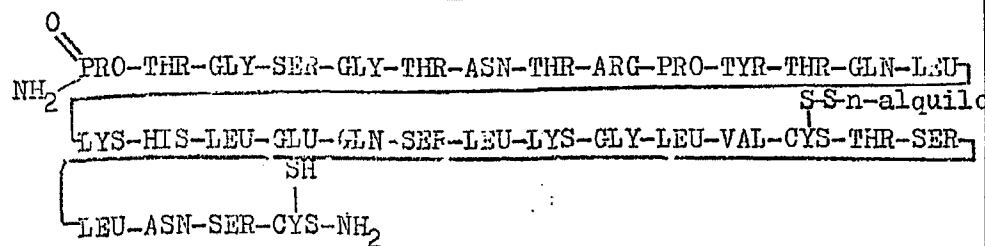


20

25

Si en el ciclo 7 se utilizan derivados de BOC-S-n-
alquiltio-L-cisteína y en la posición 1 se utilizan las BOC-
S-BZ-L-cisteínas, el péptido resultante de la escisión sería
del Tipo II y estaría representado por la fórmula:

Tipo II



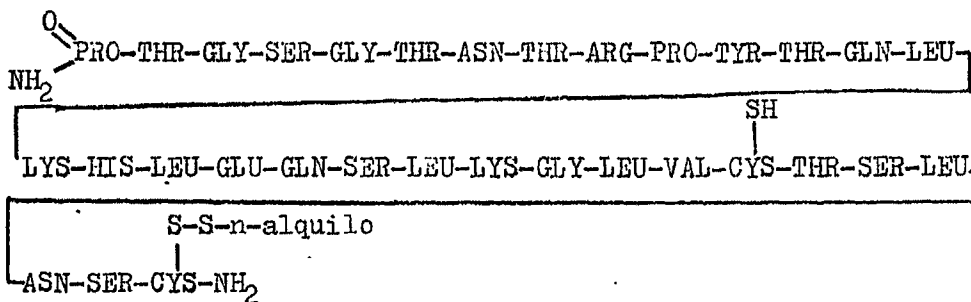
30

1

Si se utiliza BOC-S-BZ-L-cisteína en la posición 7 y BOC-S-n-alkyl-L-cisteína en la posición 1, el péptido resultante de la escisión con HF sería un péptido del Tipo III, representado por la fórmula:

5

Tipo III



10

Cada uno de los tres tipos antes descritos puede ser convertido en calcitonina de salmón totalmente activa por métodos que describiremos a continuación.

15

Formación de la estructura cíclica de disulfuro

La solución de péptido crudo obtenida en el proceso de escisión con HF puede ser convertida en calcitonina activa de salmón convirtiendo el péptido no cíclico en la forma cíclica con un puente de disulfuro entre los restos de cisteína de las posiciones 1 y 7. El procedimiento empleado para la formación del ciclo de disulfuro está determinado por los derivados de cisteína utilizados durante la síntesis de la resina-péptido. El péptido Tipo I obtenido después de escisión con HF de la resina-péptido requiere un proceso oxidativo de formación de anillo. Con los péptidos de los Tipos II y III, puede emplearse un nuevo procedimiento no oxidativo. Estos métodos se describen a continuación.

20

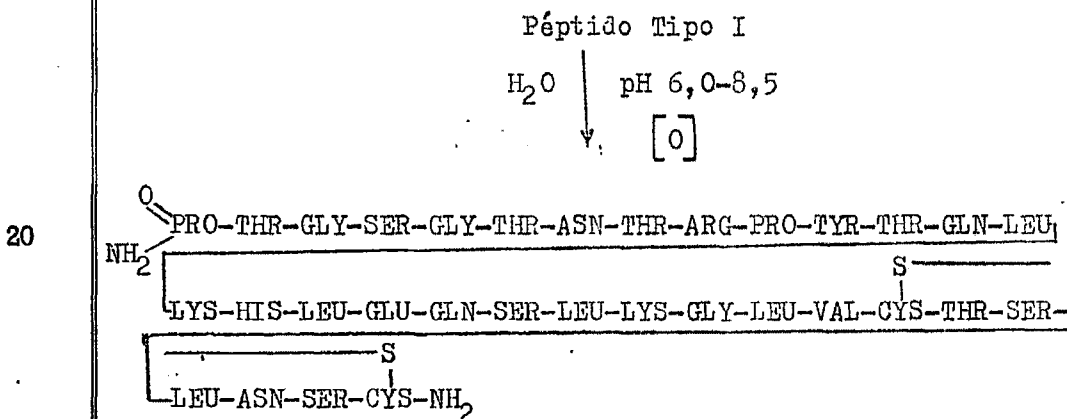
25

Péptido Tipo I

30

El péptido Tipo I contiene restos de cisteína con grupos tioles libres. El cierre del anillo de disulfuro se

1 realiza mediante un proceso oxidativo. La reacción puede uti-
lizar oxígeno atmosférico como agente oxidante. La solución
cruda en ácido acético acuoso del péptido obtenido en la es-
cisión con HF puede ser diluída con agua destilada hasta un
5 volumen de 50 a 200 ml por gramo de resina-péptido escindida.
El pH de esta solución puede ser elevado a 6,0-8,5 mediante
adición de una solución de hidróxido amónico. Puede hacerse
pasar aire por la solución durante 2 a 20 horas o hasta que
ya no puede detectarse tiol libre en la solución. El pH de la
10 solución se reduce a 3-5 por adición de ácido acético. El
péptido se ha convertido ahora en calcitonina de salmón y
puede ser purificado. Pueden emplearse otros agentes oxidan-
tes en lugar del oxígeno atmosférico, como ión ferricianuro
y ácido diazendicarboxílico (N,N-dimetilamida). La reacción
15 es ilustrada a continuación:



25 El péptido ha sido convertido ahora en calcitonina
de salmón. La solución de péptido crudo obtenida puede ser
purificada cromatográficamente para dar un producto liofili-
zado idéntico en propiedades químicas y en actividad bioló-
gica a la calcitonina de salmón natural.

30

1

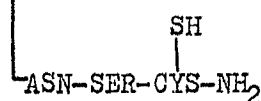
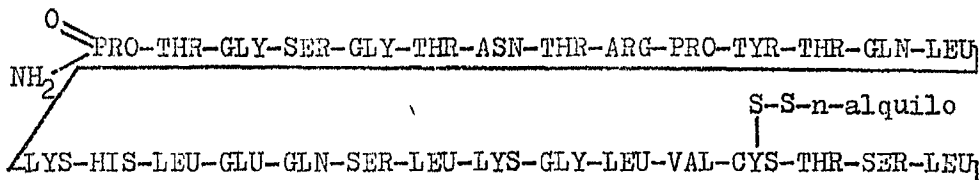
Péptido Tipo II

5

10

El péptido Tipo II contiene un tiol libre en la cisteína de la posición 1 y un grupo S-n-alquiltio en la cisteína de la posición 7. Este péptido se convierte en calcitonina cíclica de salmón por el nuevo procedimiento no oxidativo indicado en nuestra solicitud de patente copendiente nº . Este método implica la transposición de enlaces de disulfuro para formar el enlace interno de disulfuro de la calcitonina de salmón con desplazamiento del grupo n-alquilmercaptano. Esta reacción es representada como sigue:

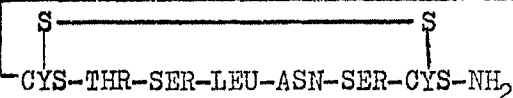
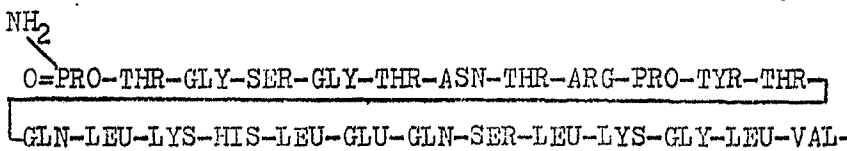
15



H₂O pH 6,0 a 8,5



20



25

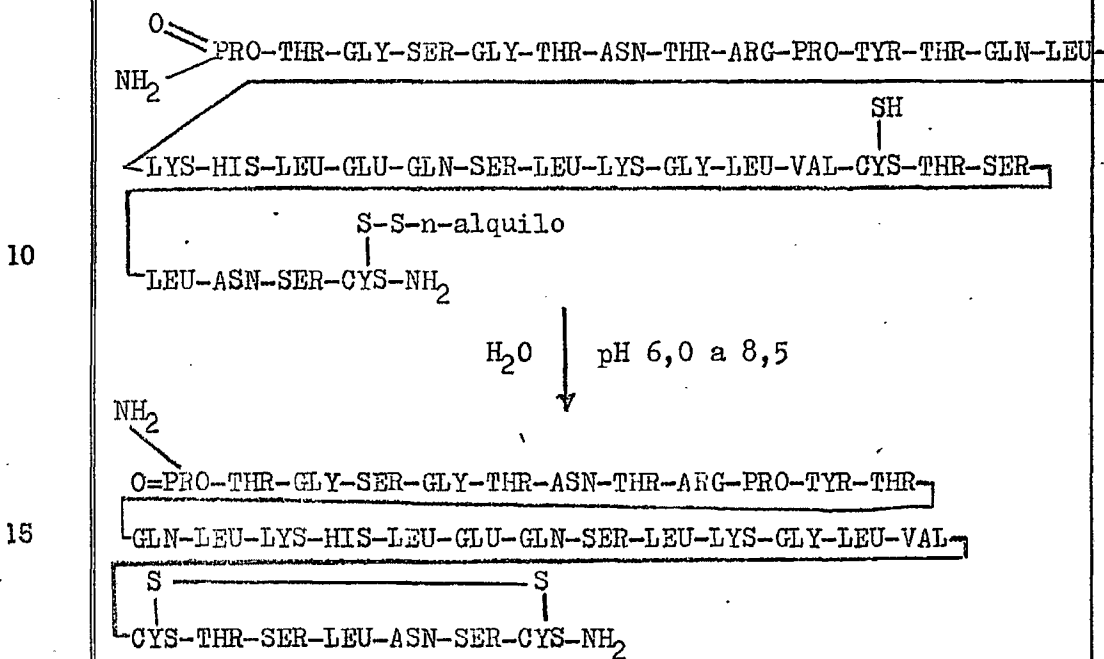
+ n-alquilmercaptano.

Péptido Tipo III

30

El péptido Tipo III contiene un tiol libre en la cisteína de la posición nº 7 y un grupo S-n-alquiltio en la cisteína de la posición 1. Este péptido, también puede ser convertido en calcitonina cíclica de salmón por el nuevo pro-

1 cedimiento no oxidativo indicado en nuestra solicitud de pa-
tente copendiente nº , que implica la transposición
de los enlaces disulfuro para formar el enlace interno de di-
sulfuro en la calcitonina de salmón con desplazamiento de
5 n-alquilmercaptano. Esta reacción es ilustrada como sigue:



15 + alquilmercaptano.

20 La reacción puede llevarse a cabo con los péptidos
del Tipo II o Tipo III, diluyendo con agua destilada la solu-
ción acuosa en ácido acético del péptido crudo Tipo II o III
procedente de la escisión con HF hasta un volumen final de
50 a 200 ml por gramo de resina-péptido escindida. El pH de
esta solución se ajusta a 6-9 por adición de una solución de
25 hidróxido amónico y la mezcla se agita en una vasija cerrada
bajo una corriente de gas inerte, como nitrógeno, durante
2 a 48 horas. El periodo de reacción puede interrumpirse cuan-
do la corriente gaseosa de salida ya no contiene n-alquil-
mercaptano. El pH de la mezcla de reacción puede reducirse
30 a 3,5-5,5 por adición de ácido acético glacial.

1 El péptido ha sido convertido ahora en calcitonina
de salmón. La solución de péptido crudo obtenida puede ser
purificada cromatográficamente para dar un producto liofi-
lizado idéntico en propiedades químicas y actividad bioló-
gica a la calcitonina natural de salmón.

5 Purificación de la calcitonina cruda de salmón

Las soluciones de calcitonina cruda de salmón a pH
5,0 procedentes de la síntesis anterior pueden ser concentra-
das utilizando un procedimiento de cambio de ión. El concen-
trado puede ser purificado mediante una combinación de pro-
cesos de filtración de gel y métodos de cromatografía por
cambio de ión. El producto purificado final puede ser obte-
nido de la solución por liofilización en forma de un sólido
blanco esponjoso. Se encuentra que este producto es química
y biológicamente equivalente al producto indicado en la bi-
bliografía (Güttman, S. y colaboradores, Helv. Chim. Acta 52,
1789-95 (1969)). El producto da el análisis de aminoácidos
correcto para la calcitonina de salmón.

20 A continuación damos ejemplos específicos de la pre-
paración de calcitonina de acuerdo con nuestros procedimien-
tos.

EJEMPLO 1

Activación de la resina

25 En un reactor del sintetizador de péptidos vendido
por Schwarz-Mann, Inc. de Orangeburg, New York, se introducen
5 g de resina BHA con un título de amina de 0,61 miliequiva-
lentes/g. La resina se trata con 25 ml de los siguientes di-
solventes, filtrando después de cada tratamiento.

Cloruro de metileno durante 2 minutos

30 Cloroformo durante 2 minutos, dos veces

1 Trietilamina al 10 % en peso en cloroformo durante
 5 minutos, dos veces
 Cloroformo durante 2 minutos
 Cloruro de metileno durante 2 minutos, tres veces.

5 Ciclo 32

Copulación:

 Se agitan durante 10 minutos. la resina BHA, 25 ml
 de cloruro de metileno y 1,29 g (0,005 moles) de BOC-L-pro-
 lina. Se añaden 6,0 ml de solución en cloruro de metileno
10 de dicitclohexilcarbodiimida (1 miliequivalente de DCCI por
 cada ml de solución) al reactor y la mezcla se agita durante
 6 horas. Se saca la mezcla de reacción del reactor por fil-
 tración y la BOC-prolil-resina BHA se somete a los siguien-
 tes lavados sucesivos durante 2 minutos, empleando 25 ml,
15 retirando las aguas de lavado por filtración cada vez:

 Cloruro de metileno, dos veces

 Alcohol metílico, dos veces

 Cloruro de metileno, tres veces.

Acetilación:

20 Después la resina se agita con una mezcla de 1,5 ml
 de trietilamina (TEA), 1 ml de anhídrido acético y 25 ml de
 cloroformo, durante 2 horas. La mezcla de reacción se separa
 por filtración y la resina se somete a los siguientes lava-
 dos de 2 minutos, con 25 ml:

25 Cloroformo, dos veces

 Alcohol metílico, dos veces

 Cloruro de metileno, tres veces.

Desprotección:

30 La resina protegida con BOC se agita durante 5 minu-
 tos con una mezcla de 15 ml de ácido trifluoracético (TFA)

1 y 15 ml de cloruro de metileno. Esta mezcla se separa por
filtración y la resina se agita con una segunda mezcla de
15 ml de TFA y 15 ml de cloruro de metileno, durante 30 mi-
5 nutos. La mezcla de reacción se separa por filtración y la
resina se somete a los siguientes lavados, con 25 ml:

Cloruro de metileno, dos veces, 2 minutos cada vez

Alcohol metílico, dos veces, 2 minutos cada vez

Cloroformo, dos veces, 2 minutos cada vez

TEA al 10 % en cloroformo, dos veces, 10 minutos ca-
10 da vez

Cloroformo, dos veces, 2 minutos cada vez

Cloruro de metileno, dos veces, 2 minutos cada vez.

La L-prolina-resina BHA se valora para establecer el
15 título de amina o prolina. Este valor es de 0,55 miliequiva-
lentes de amina o prolina por gramo de resina.

Ciclo 31

Copulación:

Se agitan durante 10 minutos la L-prolil-resina,
25 ml de cloruro de metileno y 1,7 g (0,0055 moles) de BOC-
20 O-bencil-L-treonina. Después se añaden al reactor 5,5 ml de
solución en cloruro de metileno de dicitclohexilcarbodiimida
(1 miliequivalente de DCCI por cada ml de solución o un
total de 0,0055 moles de DCCI) y la mezcla se agita durante
2 horas. Se saca la mezcla de reacción del reactor y la re-
25 sina se somete a los siguientes lavados sucesivos de 2 minu-
tos, con 25 ml, separando las aguas de lavado por filtración
cada vez.

Cloruro de metileno, dos veces

Alcohol metílico, dos veces

30 Cloruro de metileno, tres veces.

1 El ensayo con ninhidrina es negativo.

Desprotección:

Se repite en este ciclo el procedimiento de desprotección descrito en el Ciclo 32.

5 Ciclos 30 a 27

Los procedimientos de copulación y desprotección utilizados en estos ciclos son iguales a los del Ciclo 31, a excepción de que en lugar del derivado de treonina se utilizaron los siguientes derivados de aminoácidos:

10 Ciclo 30 - 0,97 g (0,0055 moles) de BOC-glicina

Ciclo 29 - 1,62 g (0,0055 moles) de BOC-O-bencil-L-serina

Ciclo 28 - El material utilizado es el mismo que en el Ciclo 30

15 Ciclo 27 - El material utilizado es el mismo que en el Ciclo 31.

Ciclo 26

Copulación:

20 La resina-péptido obtenida en el Ciclo 27 se lava dos veces con 25 ml cada vez de dimetilformamida (DMF). Después la resina se agita durante 24 horas con una solución de 2,9 g (0,008 moles) de éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina en 35 ml de DMF. Se filtra la mezcla de reacción y la resina-péptido se somete a lavados de dos minutos con
25 dos porciones sucesivas de 25 ml de los siguientes disolventes: DMF, cloruro de metileno, metanol, cloruro de metileno. Cada disolvente individual se separa por filtración. El ensayo con ninhidrina es negativo.

Desprotección:

30 Se repite el procedimiento de desprotección utili-

1 zado en el Ciclo 32.

Ciclo 25

5 Los procedimientos de copulación y desprotección son los mismos que en el Ciclo 31, utilizando los mismos materiales y cantidades.

Ciclo 24

Copulación:

10 La resina-péptido obtenida en el Ciclo 25 se lava con dos porciones sucesivas de 25 ml de DMF. La resina-péptido se agita después durante 10 minutos con una mezcla de 3,43 g (0,008 moles) de BOC-N- γ -tosil-L-arginina y 25 ml de DMF. Después se añaden 8 ml de DCCI en cloruro de metileno (equivalentes a 0,008 moles de DCCI) y la mezcla se agita durante 6 horas. La mezcla de reacción se separa por filtra-
15 ción. La resina-péptido se somete a dos minutos de lavado con dos porciones sucesivas de 25 ml de los siguientes disolventes: DMF, cloruro de metileno, alcohol metílico, cloruro de metileno. El ensayo con ninhidrina es negativo.

Desprotección:

20 Se repiten los procedimientos de desprotección utilizados en el Ciclo 32.

Ciclo 23

Copulación:

25 La resina-péptido obtenida en el Ciclo 24 se agita durante 10 minutos con 1,77 g (0,008 moles) de BOC-L-proli-
na y 25 ml de cloruro de metileno. Se añaden 8 ml de DCCI en cloruro de metileno (equivalente a 0,008 moles de DCCI) y la mezcla se agita durante 6 horas. La mezcla de reacción se separa por filtración y la resina-péptido se somete a
30 2 minutos de lavado con dos porciones sucesivas de 25 ml

1 de los siguientes disolventes: cloruro de metileno, alcohol metílico, cloruro de metileno. Cada lavado individual se separa por filtración. El ensayo con ninhidrina es negativo.

5 Desprotección: Se repite el procedimiento de desprotección utilizado en el Ciclo 32.

Ciclos 22 y 21

10 Los procedimientos de copulación y desprotección utilizados en estos ciclos son los mismos que en el Ciclo 24, a excepción de que en la reacción de copulación se utilizan los siguientes derivados de aminoácido en lugar de la BOC-L-prolina.

Ciclo 22 - 2,97 g (0,008 moles) de BOC-O-bencil-L-tirosina

15 Ciclo 21 - 2,47 g (0,008 moles) de BOC-O-bencil-L-treonina

Ciclo 20

20 Este procedimiento es el mismo del Ciclo 26 a excepción de que se emplean 3,0 g (0,008 moles) de éster p-nitrofenílico de BOC-L-glutamina en lugar del derivado de asparagina.

Ciclos 19 a 15

25 El procedimiento es el mismo utilizado en el Ciclo 31, a excepción de que se utilizan los siguientes derivados de aminoácidos en lugar del derivado de treonina:

Ciclo 19 - 1,37 g (0,0055 moles) de BOC-L-leucina

Ciclo 18 - 2,09 g (0,0055 moles) de BOC-ε-carbo-benciloxi-L-lisina

30 Ciclo 17 - 2,58 g (0,0055 moles) de BOC-N(im)-carbo-benciloxi-L-histidina

1

Ciclo 16 - Véase el Ciclo 19

Ciclo 15 - 1,85 g (0,0055 moles) del éster γ -bencílico del ácido BOC-L-glutámico.

Ciclo 14

5

Igual que el Ciclo 20.

Ciclo 13

El procedimiento utilizado es el del Ciclo 23, a excepción de que en la reacción de copulación se emplean 2,36 g (0,008 moles) de BOC-O-bencil-L-serina en lugar del derivado de prolina.

10

Ciclos 12 a 9

Los procedimientos utilizados son los mismos del Ciclo 31, a excepción de que en las reacciones de copulación se emplean los siguientes derivados de aminoácidos en lugar del derivado de treonina.

15

Ciclo 12 - El mismo material utilizado en el Ciclo 19

Ciclo 11 - El material utilizado es el mismo del Ciclo 18

20

Ciclo 10 - El mismo material utilizado en el Ciclo 30

Ciclo 9 - El mismo material utilizado en el Ciclo 19.

Ciclo 8

25

Copulación:

La resina-péptido del Ciclo 9 se agita durante 10 minutos con 1,79 g (0,008 moles) de BOC-L-valina y 25 ml de cloruro de metileno. Después se añaden 8 ml de DCCI en cloruro de metileno (equivalente a 0,008 moles de DCCI) y la

30

1 mezcla se agita durante 16 horas. La mezcla de reacción se
separa por filtración. La resina-péptido se somete a 2 minu-
tos de lavado con dos porciones sucesivas de 25 ml de los
siguientes disolventes: cloruro de metileno, alcohol metí-
5 lico, cloruro de metileno. Cada lavado individual se separa
por filtración.

Desprotección:

Véase el Ciclo 32.

Ciclo 7

10 El procedimiento es el mismo utilizado en el Ciclo
31, a excepción de que en la reacción de copulación se em-
plean 1,55 g (0,0055 moles) de BOC-S-etiltio-L-cisteína en
lugar del derivado de treonina.

Ciclo 6

15 Los materiales y procedimientos utilizados son los
mismos que en el Ciclo 31.

Ciclo 5

Los materiales y procedimientos utilizados son los
mismos que en el Ciclo 29.

20

Ciclo 4

Los materiales y procedimientos utilizados son los
mismos que en el Ciclo 19.

Ciclo 3

25

Los materiales y procedimientos utilizados son los
mismos que en el Ciclo 26.

Ciclo 2

Los materiales y procedimientos utilizados son los
mismos que en el Ciclo 29.

30

Ciclo 1

Los procedimientos utilizados son los mismos que en

1 el Ciclo 31, a excepción de que se emplean 1,88 g (0,0055 moles) de BOC-S-p-metoxibencil-L-cisteína en lugar del derivado de treonina.

5 Una vez completado el Ciclo 1, la resina-péptido se lava con dos porciones sucesivas de 25 ml de n-hexano. El material péptido se saca del reactor y se seca en una estufa eléctrica a vacío a 40°C y 0,1 mm de Hg, durante 24 horas.

Escisión con fluoruro de hidrógeno

10 En una vasija de reacción de teflón, se introducen 16 g de la resina-péptido seca y 16 ml de anisol. La vasija, equipada con un agitador magnético recubierto de teflón, se introduce en un baño de hielo seco y acetona y se condensan en la vasija 100 ml de fluoruro de hidrógeno gaseoso. Esta
15 mezcla se agita a 0°C en un baño de hielo durante 1 hora. El fluoruro de hidrógeno se separa por evaporación a presión reducida. El residuo se tritura seis veces con 100 ml cada vez de acetato de etilo. El péptido se extrae de las perlas de resina con 800 ml de una solución acuosa 0,1 molar de
20 ácido acético.

Ciclación del péptido a calcitonina de salmón

25 El extracto acuoso en ácido acético obtenido de la escisión con fluoruro de hidrógeno se diluye hasta 1,5 litros por adición de 700 ml de agua destilada. El pH de la solución se ajusta a 7,5 por adición de hidróxido amónico concentrado. La solución se agita en una vasija cerrada bajo una corriente de nitrógeno durante 24 horas. En este momento no es posible detectar etilmercaptano en la corriente de nitrógeno emergente. El contenido en etilmercaptano
30 de la corriente de nitrógeno se midió haciendo pasar la co-

1 rriente a través de una solución de reactivo de Ellman
(Ellman, G.L., Arch. Biochem. Biophys., 82, 70-77 (1959)).
El pH de la mezcla de reacción se ajusta a 5,0 por adición
de ácido acético glacial.

5 Purificación de la calcitonina cruda de salmón

Los 1,5 litros de solución procedentes de la síntesis anterior, a pH 5,0, se concentran utilizando una columna cambiadora de ión de SP-Sephadex C-25. Los 75 ml de concentrado retirados de la columna con solución 0,5 M de cloruro sódico se desalifican y purifican haciéndolos pasar a través de una columna de filtración de gel de Sephadex G-25 (fino) y eluyendo con una solución acuosa 0,03 M de ácido acético. La fracción de calcitonina de salmón de esta columna se ajusta a pH 6,0 por adición de una solución de hidróxido amónico. Esta solución se purifica de nuevo por cromatografía de cambio de ión empleando una columna Whatman CM52 eluída con solución reguladora de acetato amónico. La fracción de calcitonina de salmón de esta columna se ajusta a pH 5,0 por adición de ácido acético glacial. Esta solución se concentra empleando una columna cambiadora de ión de SP-Sephadex C-25. Los 30 ml de concentrado retirados de la columna con solución 0,5 M de cloruro sódico se desalifican con una columna de filtración de gel Sephadex G-25 (fino). La fracción purificada de calcitonina de salmón se recoge y liofiliza. El producto se obtiene en forma de sólido blanco esponjoso. Se encuentra que este material es biológica y químicamente equivalente al producto registrado en la bibliografía (Guttman, S., y colaboradores, Helv. Chim. Acta 52, 1789-1795 (1969)).

30

1 La preparación de los compuestos tal como se ha des-
crito en lo que antecede o como se ha indicado en el Ejem-
plo 1 puede modificarse en muchos aspectos pero cuando se
5 introducen variaciones en más de un factor, es difícil eva-
luar cualquiera de los factores alterados. Por esta razón,
establecemos una serie de ensayos en los que solamente se
varía un factor y se comparan los resultados.

EJEMPLO 2

10 Los procedimientos indicados en el Ejemplo 1 se re-
piten utilizando los mismos materiales y las mismas cantida-
des, manteniéndose todas las condiciones idénticas en lo
prácticamente posible, a excepción de que, en el Ciclo 24,
la BOC- α -tosil-L-tirosina se sustituye por 2,55 g (0,008 mo-
les) de BOC- α -nitro-L-arginina. Los resultados obtenidos son
15 prácticamente idénticos a los indicados en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 3

20 Se repitió el procedimiento indicado en el Ejem-
plo 1 empleando los mismos materiales, las mismas cantida-
des y las mismas condiciones, a excepción de que, en el
Ciclo 22, la BOC-O-bencil-L-tirosina se sustituyó por 3,45 g
(0,008 moles) de BOC-O-2-bromobenciloxycarbonil-L-tirosina.
Los resultados obtenidos fueron similares a los indicados
en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 4

25 Todos los procedimientos, materiales y condiciones,
son iguales a los del Ejemplo 1, a excepción de que, en los
Ciclos 18 y 11, la BOC- ϵ -benciloxycarbonil-L-lisina se sus-
tituye en cada uno de estos ciclos por 2,28 g (0,0055 moles)
de BOC- ϵ -2-clorobenciloxycarbonil-L-lisina. Los resultados
30 obtenidos son prácticamente iguales a los del Ejemplo 1.

EJEMPLO 5

Pueden utilizarse los materiales, procedimientos y condiciones de la síntesis de resina-péptido utilizados en el Ejemplo 1, a excepción de que, en el Ciclo 7, la BOC-S-etiltio-L-cisteína es sustituida por 1,88 g (0,0055 moles) de BOC-S- ρ -metoxibencil-L-cisteína para preparar así el péptido Tipo I.

El extracto en ácido acético acuoso obtenido de la escisión con fluoruro de hidrógeno puede ser diluido hasta 1,5 litros por adición de 800 ml de agua destilada y el pH ajustado a 7,0 por adición de hidróxido amónico concentrado. Después puede hacerse pasar una corriente de aire por la solución durante un periodo de 8 horas. Entonces el pH de la mezcla de reacción puede reducirse a 5,0 por adición de ácido acético glacial. La purificación de la calcitonina cruda de salmón puede realizarse de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 6

Todos los materiales, procedimientos y condiciones pueden ser iguales a los del Ejemplo 1, a excepción de que, en el Ciclo 7, la BOC-S-etiltio-L-cisteína es sustituida por 1,48 g (0,0055 moles) de BOC-S-metiltio-L-cisteína.

Pueden esperarse resultados similares a los obtenidos en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 7

Todos los materiales, procedimientos y condiciones pueden ser iguales a los del Ejemplo 1, a excepción de que, en el Ciclo 1, la BOC-S- ρ -metoxibencil-L-cisteína es sustituida por 1,66 g (0,0055 moles) de BOC-S-3,4-dimetilbencil-L-cisteína. Cabe esperar resultados similares a los obteni-

1 dos en el Ejemplo 1.

EJEMPLO 8

5 Todos los materiales, procedimientos y condiciones pueden ser los mismos del Ejemplo 1, a excepción de los siguientes cambios:

<u>Ciclo</u>	<u>Cambio</u>
1	Utilizar 1,71 g (0,0055 moles) de BOC-S-bencil-L-cisteína en lugar de BOC-S-p-metoxibencil-L-cisteína.
10 7	Utilizar 1,48 g (0,0055 moles) de BOC-S-etiltio-L-cisteína en lugar de BOC-S-etiltio-L-cisteína.
11	Utilizar 2,28 g (0,0055 moles) de BOC-ε-2-clorobenciloxycarbonil-L-lisina en lugar de BOC-ε-benciloxycarbonil-L-lisina.
15 18	Igual que en el Ciclo 11 anterior.
22	Utilizar 3,95 g (0,008 moles) de BOC-O-2-bromobenciloxycarbonil-L-tirosina en lugar de BOC-O-bencil-L-tirosina.
20 24	Utilizar 2,55 g (0,008 moles) de BOC-β-nitro-L-arginina en lugar de BOC-N-γ-tosil-arginina.
	Cabe esperar resultados similares a los del Ejemplo 1.

EJEMPLO 9

25 Todos los materiales, procedimientos y condiciones pueden ser los del Ejemplo 1, a excepción de que, en el Ciclo 7, el derivado de aminoácido puede ser 1,88 g (0,0055 moles) de BOC-S-p-metoxibencil-L-cisteína y, en el Ciclo 1, el derivado de aminoácido puede ser 1,55 g (0,0055 moles) de BOC-S-etiltio-L-cisteína, para preparar así el péptido

30 Tipo III.

1 Por ciclación del péptido Tipo III y purificación del producto ciclado, debe obtenerse la calcitonina de salmón como en el Ejemplo 1.

5 Aunque solamente se han descrito con detalles específicos ciertas realizaciones de nuestra invención, resultará evidente para los expertos en esta técnica que pueden ponerse en práctica otras realizaciones específicas y pueden introducirse muchos cambios, todos ellos dentro del espíritu de la invención y se pretende que todas
10 estas realizaciones y cambios sean considerados dentro de los límites de las reivindicaciones del apéndice.

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

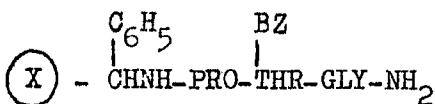
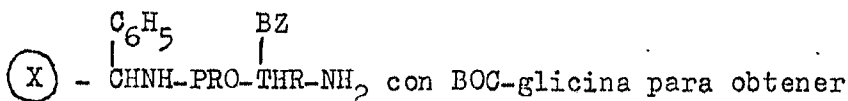
REIVINDICACIONES

15 1.- Un procedimiento de síntesis de calcitonina de salmón que comprende la operación de copular una resina de poliestireno insoluble con prolina que tiene su función α amino protegida con un grupo protector y posteriormente separar dicho grupo protector, después por procedimientos similares de reacción de protección y desprotección, copular uno a uno con los péptidos de resina formando los otros amino ácidos en la secuencia en la que aparecen en la calcitonina de salmón mientras se protege con los grupos protectores a los grupos funcionales de los
20 amino ácidos que no intervienen en las reacciones de copula hasta que se forma una resina péptida que tiene todos los amino ácidos de la calcitonina de salmón, se separa la resina y los grupos protectores restantes y unir los radicales cisteína en el péptido formado en una estructura
25 de anillo disulfuro.
30

1 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha resina es resina bendidrilamina.

5 3.- Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que dicho grupo protector de la función α amina de los aminoácidos es butiloxicarbonilo terciario.

4.- Un procedimiento según la reivindicación 1, que incluye la etapa de copular:

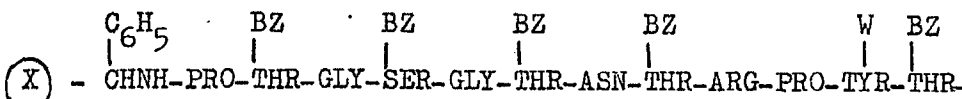


donde (X) es poliestireno

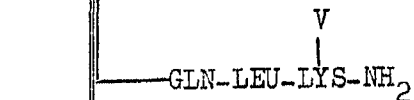
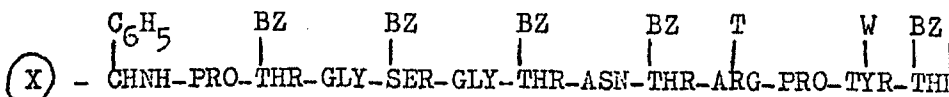
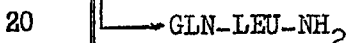
BZ es bencilo o un derivado de bencilo

y BOC es butiloxicarbonilo terciario.

15 5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, que incluye la etapa de copular



con BOC - ξ - V-lisina para obtener



donde (X) es poliestireno

BZ es bencilo o un derivado bencilo

T es nitro o tosilo

W es BZ, benciloxicarbonilo, o un derivado benciloxicarbonilo o ningún grupo protector.

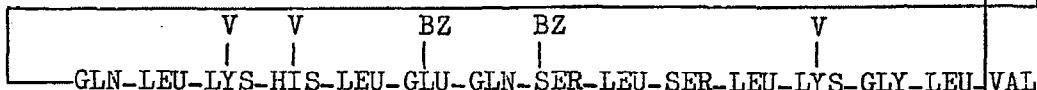
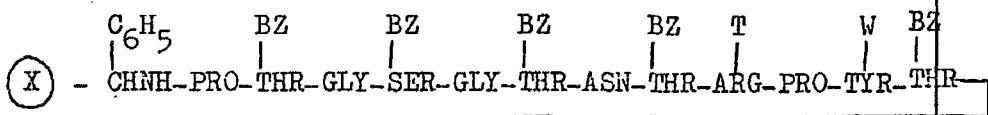
30 V es benciloxicarbonilo o un derivado benciloxicar-

1

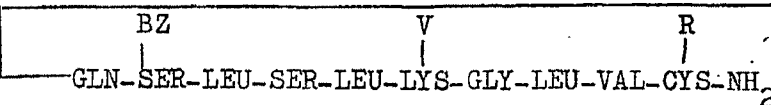
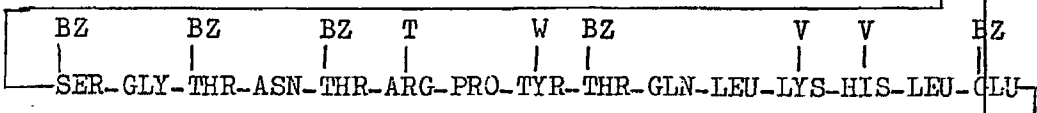
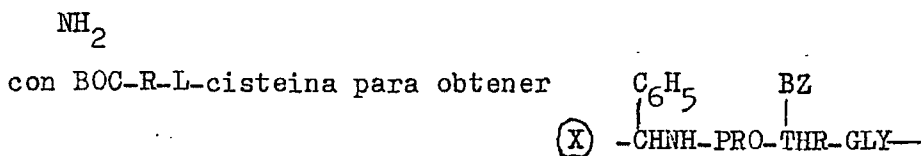
bonilo y BOC es butiloxicarbonilo terciario.

6.- Un procedimiento según la reivindicación 1, que incluye la etapa de copular

5



10



15

donde (X) es poliestireno

BZ es bencilo o un derivado bencilo.

T es nitro o tosilo

W es BZ, benciloxicarbonilo, un derivado benciloxicarbonilo o ningún grupo protector.

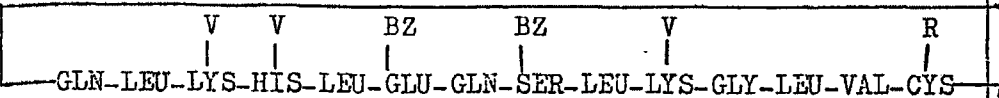
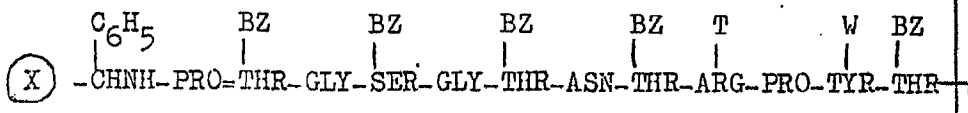
20

R es un grupo n-alquiltio

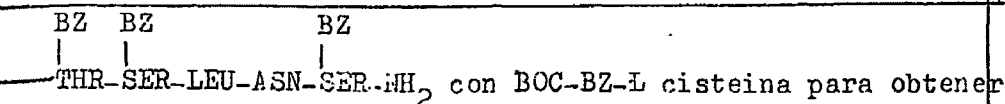
y BOC es butiloxicarbonilo terciario.

7.- Un procedimiento según la reivindicación 1, que incluye la etapa de copular

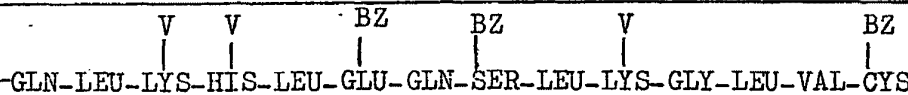
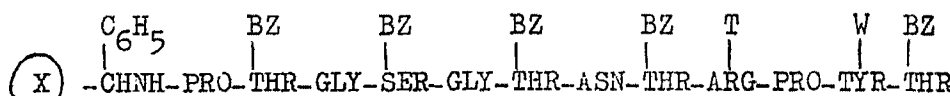
25



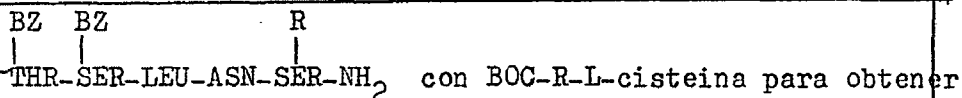
30



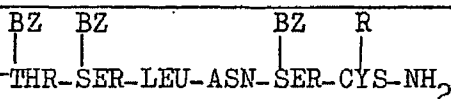
1



5



10



donde X es poliestireno

BZ es bencilo o un derivado bencilo

15

T es nitro o tosilo

W es BZ, benciloxicarbonilo, un derivado benciloxicarbonilo o ningún grupo protector.

V es benciloxicarbonilo o un derivado benciloxicarbonilo

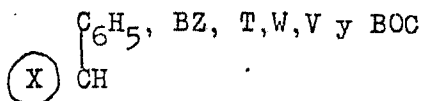
20

BOC es butiloxicarbonilo terciario.

y R es un grupo n-alquiltio

10.- Un procedimiento según la reivindicación 9 que incluye la etapa de separación de

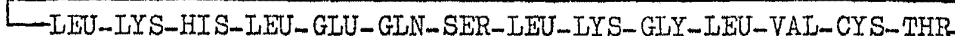
25



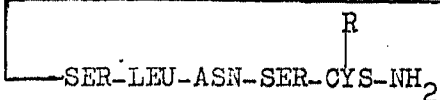
de la estructura obtenida de dicha copula, para obtener la estructura:

30

1



5



11.- Un procedimiento según la reivindicación 10 en la que dicha separación se realiza por tratamiento con fluoruro de hidrógeno.

10

12.- Un procedimiento según la reivindicación 1, en la que dicha estructura de anillo de disulfuro se forma manteniendo dicho péptido con dos radiales cisteina uno de los cuales contiene una función sulfhidrilo libre y la otra tiene su función sulfhidrilo protegida por un grupo n-alquiltio que participa en un enlace disulfuro con la función tiol del mencionado radical en una solución sustancialmente libre de oxígeno hasta que se lleve a cabo la reagrupación para dar el péptido disulfuro cíclico.

15

13.- Un procedimiento según la reivindicación 12, en la que dicho grupo alquilo en dicho grupo n-alquiltio es etilo, metilo, propilo o butilo.

20

14.- Un procedimiento según la reivindicación 13, en que dicho grupo alquilo es etilo.

15.- Un procedimiento según la reivindicación 12, que incluye la etapa de agitación de dicha solución durante la reagrupación.

25

16.- Un procedimiento según la reivindicación 12, que incluye el conducir dicha reagrupación por una corriente de gas inerte.

30

17.- Un procedimiento según la reivindicación 16, que incluye el continuar manteniendo dicho péptido en dicha

1 solución hasta que el gas que pasa por encima de dicha solución quede sustancialmente libre de mercaptano.

18.- Un procedimiento según la reivindicación 16, en el que dicho gas es nitrógeno.

5 19.- Un procedimiento según la reivindicación 12 en el que dicho péptido con dos radicales cisteína se mantiene en dicha solución a una temperatura de -20° a -15°C.

10 20.- Se reivindica por último como objeto sobre el que ha de recaer la patente de invención que se solicita
UN PROCEDIMIENTO DE SINTESIS DE CALCITONINA DE SALMON.

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

Madrid 12 agosto 1.975

15

BERNARDO UNGRIA

P.P.



20

25

30