

Int. Cl.º: CO7C

Nº 440.922.

MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

CONCEDIDA
SOLICITANTE: ARMOUR PHARMACEUTICAL COMPANY.
RESIDENCIA: Greyhound Towers, PHOENIX, Arizona

25 FEB. 1977

85077 ESTADOS UNIDOS.-

ENUNCIADO: UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION
DE UN PEPTIDO CON UNA ESTRUCTURA CICLI
CA DE DISULFURO.

Prioridad: Patente estadounidense n.º 505.344 del 12.9.74.

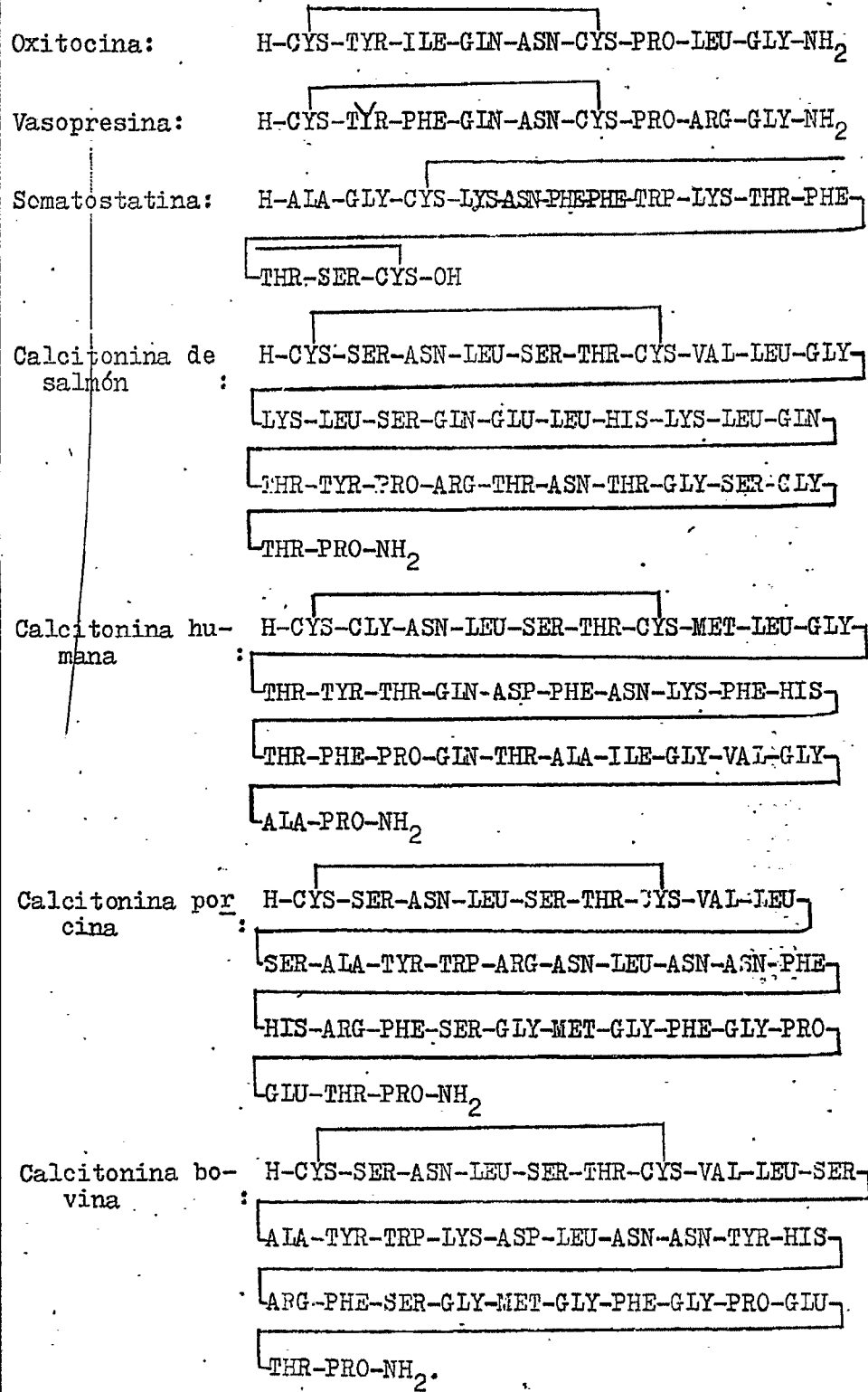
1 teína en las posiciones primera y séptima de sus cadenas de
aminoácidos. La oxitocina es útil para la inducción o estimula-
ción terapéutica del parto en los seres humanos y animales y
también para controlar la hemorragia uterina post-parto. Con-
5 tiene una estructura cíclica de disulfuro entre los grupos de
cisteína de las posiciones 1 y 6 de su cadena de aminoácidos.
La vasopresina y su análoga la lipresina se utilizan como dro-
gas antidiuréticas en el hombre y contienen estructuras cíclica
cas de disulfuro entre los grupos de cisteína de las posicio-
10 nes 1 y 6 de sus secuencias de aminoácidos (Handbook of Bio-
chemistry, págs. C-164 a C-188). La somatostatina, un péptido
disulfurado recientemente descubierto (P. Brazeau y colabora-
dores, Science, 179, 77 [1973]), ha sido propuesta como de in-
terés terapéutico en el tratamiento de la acromegalia y diabe-
15 tes. La somatostatina contiene un enlace de disulfuro entre
los restos de cisteína de las posiciones 3 y 14 de su secuen-
cia de aminoácidos (R. Burgus y colaboradores, Proc.Nac.Acad.
Sci, U.S., 70, 684 [1973]).

20 Aunque el tipo y la secuencia de los grupos aminoáci-
do de las calcitoninas, oxitocina, vasopresina, somatostatina
y otros péptidos naturales de este tipo puede variar con la
especie de la que son obtenidos, todos estos péptidos que
eran originalmente obtenidos de fuentes naturales, por ejem-
25 plo por extracción de las glándulas de seres humanos, anima-
les domésticos, peces, ranas o reptiles, contienen la estruc-
tura cíclica antes citada. La secuencia de aminoácidos de
algunos péptidos conocidos biológicamente activos, que contie-
nen grupos de cisteína unidos a través de puentes de disulfu-
30 ro en una estructura cíclica, se encuentra en la Tabla I.

TABLA I

Péptidos típicos conteniendo estructuras cíclicas de cisteína

1
5
10
15
20
25
30



1 En intentos anteriores para preparar sintéticamente
un péptido como los descritos en la Tabla I, el único méto-
do existente para producir una estructura cíclica cerrada de
disulfuro era tratar de formar un péptido no cíclico con la
5 cadena de aminoácidos deseada y después someter este péptido
a un proceso oxidativo empleando agentes oxidantes para for-
mar el puente de disulfuro entre los dos restos de cisteína.
Estos métodos oxidativos han sido descritos en la bibliogra-
fía (Katsoyannis, P.G., The Chemistry of Polypeptides, Plenum
10 Press, 1974, págs. 60-85). Un inconveniente importante de es-
tos procedimientos es la exposición de la molécula de pépti-
do altamente lábil a los agentes oxidantes. Este tratamiento
puede inactivar el péptido dando lugar a un menor rendimiento
de productos biológicamente activos.

15 Desde hace tiempo se necesita un procedimiento para
la formación del puente de disulfuro entre los radicales de
cisteína de un péptido, que no requiera el uso de agentes oxi-
dantes. En consecuencia, nos hemos dedicado al descubrimiento
de un método práctico y eficiente para la formación de un
20 puente de disulfuro cíclico entre los radicales de cisteína
de un péptido.

COMPENDIO

25 Hemos encontrado un método de síntesis de péptidos
cíclicos de disulfuro, donde se forma un puente de disulfuro
entre dos restos de cisteína en un péptido mediante un senci-
llo proceso en el que no es necesario tratar el péptido con
agentes oxidantes. Este proceso implica la provisión de un
péptido en el que uno de los grupos cisteína lleva unido un
grupo n-alquiltio que participa en un puente de disulfuro con
30 la función tiol del grupo de cisteína. Este péptido puede ser

1 obtenido utilizando en la síntesis de la secuencia de amino-
ácidos del péptido un grupo protector diferente para proteger
la función tiol de uno de los grupos cisteína, a saber, un
5 grupo n-alquiltio que no es separado en la siguiente etapa
de escisión. El péptido no cíclico resultante conteniendo el
grupo n-alquiltio unido a un radical de cisteína puede ser
mantenido en solución exenta de oxígeno hasta que tiene lugar
la transposición espontánea, que completa el anillo de disulfu-
ro entre los radicales de cisteína con desplazamiento del gru-
10 po protector n-alquiltio.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Nuestro procedimiento mejorado es aplicable a la sín-
tesis de cualquier péptido de disulfuro cíclico donde el puen-
te disulfuro se encuentra entre dos restos de cisteína en la
15 cadena de aminoácidos. El procedimiento es especialmente ve-
tajoso en la síntesis de péptidos lábiles, biológicamente
activos, porque la formación del puente de disulfuro se rea-
liza en condiciones que evitan la oxidación y que no perturban
por lo demás a la estructura del péptido.

20 Podemos comenzar con la preparación de un péptido no
cíclico y construir la cadena de aminoácidos de la oxitocina,
calcitonina o cualquier otro péptido de este tipo que contenga
dos restos de cisteína. La cadena de aminoácidos puede ser
montada por aplicación de técnicas clásicas de síntesis o las
25 modernas técnicas en fase sólida (Merrifield, R.B. "Advances
in Enzymology" Interscience, New York, 1969, Capítulo 32, 221-
296 y Stuart, J. y Young, J. "Solid Phase Peptide Synthesis",
W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1969).

30 Preferimos utilizar el tipo de síntesis en fase sólida.
En esta síntesis, los aminoácidos se agregan uno a uno a la

1 resina hasta que se ha construido sobre la resina la secuen-
cia total del péptido. Los grupos funcionales de los aminoáci-
dos son protegidos mediante grupos de bloqueo. El grupo α -ami-
no de los aminoácidos es protegido por un grupo terc-butiloxi-
5 carbonilo o un equivalente del mismo. Este grupo α -terc-butil-
oxicarbonilo será denominado BOC. Las funciones hidroxilo de
la serina y la treonina son protegidas con un grupo benci-
lo o derivado bencílico tal como 4-metoxibencilo, 4-metilbenc-
lo, 3,4-dimetilbencilo, 4-clorobencilo, 2,6-diclorobencilo,
10 4-nitrobencilo, benzohidrido o un equivalente del mismo. Uti-
lizamos el término BZ para representar los grupos bencilo o
derivado bencílico. La función hidroxilo de la tirosina pue-
de quedar sin proteger, puede ser protegida con un grupo ben-
cilo o derivado bencílico como se ha descrito antes, por ejem-
15 plo un grupo BZ, o puede estar protegida con un grupo bencil-
oxicarbonilo o derivado del benciloxicarbonilo, tal como 2-
clorobenciloxicarbonilo o un grupo 2-bromobenciloxicarbonilo
o un equivalente del mismo. Utilizamos el término W para repre-
sentar o bien ningún grupo protector o bien un grupo BZ, un
20 grupo benciloxicarbonilo o un grupo derivado benciloxicarbo-
nílico. La función guanidino de la arginina puede ser prote-
gida con un grupo nitro, un grupo tosilo o un equivalente del
mismo. Utilizamos la letra T para representar un grupo nitro
o un grupo tosilo. La función ϵ -amino de la lisina puede
25 ser protegida mediante un grupo benciloxicarbonilo o un deri-
vado benciloxicarbonílico tal como 2-clorobenciloxicarbonilo,
2-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetilbenciloxicarbonilo o
un equivalente de los mismos. Utilizamos la letra V para re-
presentar un grupo benciloxicarbonilo o un derivado benciloxi-
30 carbonílico. Los grupos protectores utilizados en el nitróge-

1 no imidazólico de la histidina son el grupo benciloxycarbonilo
y derivados benciloxycarbonílicos como los descritos antes al
tratar de la lisina y designados con la letra V. Los grupos
ácido ω -carboxílico de los ácidos glutámico y aspártico son
5 protegidos con un grupo bencilo o derivado bencilico como los
descritos para la protección de la función hidroxilo de la
serina y la treonina. Estos grupos protectores son representa-
dos por el símbolo BZ.

10 Los péptidos a los cuales es aplicable nuestro proce-
dimiento mejorado de ciclación contienen como mínimo dos gru-
pos cisteína y podemos proteger uno u otro de estos grupos con
un grupo n-alquiltio mientras que el otro puede estar protegi-
do con un grupo BZ que se separa en el tratamiento ácido pos-
15 terior junto con los otros grupos protectores que pudieran
quedar entonces. Utilizamos el símbolo SR para representar el
grupo n-alquiltio donde R es un grupo alquilo que preferible-
mente es metilo, etilo, propilo o butilo, seleccionándose ha-
bitualmente el grupo etilo como el mejor.

20 La cisteína que contiene el grupo protector n-alquiltio
puede ser agregada a la cadena de aminoácidos en cualquie-
ra de las dos posiciones de la cisteína dentro de la secuen-
cia deseada mientras que la cisteína que contiene el grupo
protector BZ es agregada en la otra posición de la cisteína.
25 Por ejemplo, la oxitocina contiene restos de cisteína en la
primera y sexta posiciones y el grupo n-alquiltio puede ser
utilizado en la sexta posición mientras el grupo BZ se utili-
za en la primera posición o bien el grupo BZ puede ser utili-
zado en la sexta posición y el grupo n-alquiltio en la pri-
30 mera.

1 De acuerdo con la tecnología en fase sólida, el aminoácido en la posición de número más alto en la cadena del péptido que ha de ser sintetizado se copula a la resina utilizando los grupos protectores antes citados, seguido de eliminación de los grupos protectores BOC del grupo α -amino; 5 después se combina el siguiente aminoácido de la posición más alta posterior al último grupo aminoácido añadido, utilizando grupos protectores apropiados como antes y se separa el grupo protector BOC etc, hasta que se completa la cadena deseada de 10 aminoácidos. Pueden obtenerse combinaciones apropiadas de grupos aminoácido y grupo protectores y estas combinaciones pueden hacerse reaccionar con el péptido previamente formado para agregar los grupos aminoácidos sucesivos. Estas combinaciones pueden obtenerse comercialmente de los almacenes de 15 productos químicos.

20 Para ilustrar la síntesis de las cadenas de aminoácidos que aparecen en los péptidos a los que es aplicable nuestro procedimiento, damos en las Tablas II a VIII algunas sustancias reaccionantes típicas (que contienen el grupo aminoácido y los grupos protectores) para uso en la síntesis de secuencias típicas de las cadenas de aminoácidos. Cada una de las sustancias reaccionantes dadas en las Tablas II a VIII pueden ser adquiridas en los almacenes de productos químicos, 25 excepto quizá el grupo BOC-S-alquiltio que puede ser preparado por el método descrito en la bibliografía (V. Weber y P. Hartter, Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem. 351, 1384-8 [1970]).

30



TABLA II

Sustancias reaccionantes típicas para uso en la síntesis de
oxitocinas

<u>Número de posición</u>	<u>Aminoácido reaccionante</u>
5	9 BOC-glicina
	8 BOC-L-leucina
	7 BOC-L-prolina
	6 BOC-S-etiltio-L-cisteína,
10	BOC-S-metiltio-L-cisteína,
	BOC-S-n-propiltio-L-cisteína o
	BOC-S-n-butiltio-L-cisteína
	5 éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina
	4 éster p-nitrofenílico de BOC-L-glutamina
15	3 BOC-L-isoleucina,
	2 BOC-O-bencil-L-tirosina,
	BOC-L-tirosina o
	BOC-O-2-bromobenciloxycarbonil-L-tirosina
	1 BOC-S-p-metoxibencil-L-cisteína,
20	BOC-S-bencil-L-cisteína o
	BOC-S-3,4-dimetilbencil-L-cisteína.
25	
30	

TABLA III

Sustancias reaccionantes típicas para uso en la síntesis de
calcitonina de salmón

5	Número de posición	Aminoácido reaccionante
	32	BOC-L-prolina
	31	BOC-O-bencil-L-treonina
	30	BOC-glicina
	29	BOC-O-bencil-L-serina
10	28	BOC-glicina
	27	BOC-O-bencil-L-treonina
	26	éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina
	25	BOC-O-bencil-L-treonina
	24	BOC- Ω -nitro-L-arginina o
15		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
20	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
25	17	BOC-N(α)-CBZ-L-histidina
	16	BOC-L-leucina
	15	éster γ -bencílico de ácido BOC-L-glutámico
	14	éster p-nitrofenílico de BOC-L-glutamina
	13	BOC-L-bencil-L-serina
30	12	BOC-L-leucina

TABLA III (continuación)

Número de posición	Aminoácido reaccionante
11	BOC- ξ -CBZ-L-lisina o
5	BOC- ξ -2-clorobenciloxycarbonil-L-lisina
10	BOC-glicina
9	BOC-L-leucina
8	BOC-L-valina
7	BOC-S- ϵ -tíltio-L-cisteína,
10	BOC-S-metiltio-L-cisteína,
	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
15	4 BOC-L-leucina
3	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
20	BOC-S-3,4-dimetilbencil-L-cisteína

25

30

TABLA IV

Sustancias reaccionantes típicas para uso en la síntesis de
calcitonina humana

Número de posición	Aminoácido reaccionante
32	BOC-L-prolina
31	BOC-L-alanina
30	BOC-glicina
29	BOC-L-valina
10	28 BOC-glicina
	27 BOC-L-isoleucina
	26 BOC-L-alanina
	25 BOC-O-bencil-L-treonina
	24 éster p-nitrofenílico de BOC-L-glutamina
15	23 BOC-L-prolina
	22 BOC-L-fenilalanina
	21 BOC-O-bencil-L-treonina
	20 BOC-N(im)-CBZ-L-histidina
	19 BOC-L-fenilalanina
20	18 BOC- ξ -CBZ-L-lisina o
	BOC- ξ -2-clorobenciloxicarbonil-L-lisina
	17 éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina
	16 BOC-L-fenilalanina
	15 éster γ -bencílico de ácido BOC-L-aspártico
25	14 éster p-nitrofenílico de BOC-L-glutamina
	13 BOC-O-bencil-L-treonina
	12 BOC-O-bencil-tirosina,
	BOC-L-tirosina o
	BOC-O-2-bromobenciloxicarbonil-L-tirosina
30	11 BOC-O-bencil-L-tirosina

TABLA IV (continuación)

Número de posición	Aminoácido reaccionante
1	10 BOC-glicina
5	9 BOC-L-leucina
	8 BOC-L-metionina
	7 BOC-S-etiltio-L-cisteína,
	BOC-S-metiltio-L-cisteína,
	BOC-S-n-propiltio-L-cisteína o
10	BOC-S-n-butiltio-L-cisteína
	6 BOC-O-bencil-L-treonina
	5 BOC-O-bencil-L-serina
	4 BOC-L-leucina
	3 éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina
15	2 BOC-glicina
	1 BOC-S-p-metoxibencil-L-cisteína,
	BOC-S-bencil-L-cisteína o
	BOC-S-3,4-dimetilbencil-L-cisteína.
20	
25	
30	

TABLA V

Sustancias reaccionantes típicas para uso en la síntesis de vasopresina

Número de posición	Aminoácidos reaccionantes
9	BOC-glicina
8	BOC- ω -tosil-L-arginina o BOC- ω -nitro-L-arginina
7	BOC-L-prolina
10	6 BOC-S-etiltio-L-cisteína, BOC-S-metiltio-L-cisteína, BOC-S-n-propiltio-L-cisteína o BOC-S-n-butiltio-L-cisteína
15	5 éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina 4 éster p-nitrofenílico de BOC-L-glutamina 3 BOC-L-fenilalanina 2 BOC-O-bencil-L-tirosina, BOC-L-tirosina o BOC-O-2-bromobenciloxycarbonil-L-tirosina
20	1 BOC-S-p-metoxibencil-L-cisteína, BOC-S-bencil-L-cisteína o BOC-S-3,4-dimetilbencil-L-cisteína

25

30

TABLA VII

Sustancias reaccionantes típicas para uso en la síntesis de
calcitonina porcina

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

TABLA VII (continuación)

<u>Número de posición</u>	<u>Aminoácido reaccionante</u>
11	BOC-L-alanina
10	BOC-O-bencil-L-treonina
5	9 BOC-L-leucina
	8 BOC-L-valina
	7 BOC-S-etiltio-L-cisteína, BOC-S-metiltio-L-cisteína, BOC-S-n-propiltio-L-cisteína o 10 BOC-S-n-butiltio-L-cisteína
	6 BOC-O-bencil-L-treonina
	5 BOC-O-bencil-L-serina
	4 BOC-L-leucina
	3 éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina
15	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.

TABLA VIII

Sustancias reaccionantes típicas para uso en la síntesis de
calcitonina bovina

<u>Número de posición</u>	<u>Aminoácido reaccionante</u>
32	BOC-L-prolina
31	BOC-O-bencil-L-treonina
25	30 éster γ -bencílico de ácido BOC-L-glutámico
	29 BOC-L-prolina
	28 BOC-glicina
	27 BOC-L-fenilalanina
	26 BOC-glicina
30	25 BOC-L-metionina

TABLA VIII (continuación)

1	Número de posición	Aminoácido reaccionante
	24.	BOC-glicina
	23	BOC-O-bencil-L-serina
5	22	BOC-L-fenilalanina
	21	BOC- ω -tosil-L-arginina o BOC- ω -nitro-L-arginina
	20	BOC-N(im)-CBZ-L-histidina
10	19	BOC-O-bencil-L-tirosina, BOC-L-tirosina o BOC-O-2-bromobenciloxycarbonil-L-tirosina
	18	éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina
	17	éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina
	16	BOC-L-leucina
15	15	éster γ -bencílico de ácido BOC-L-aspartico
	14	BOC- ϵ -CBZ-L-lisina o BOC- ϵ -2-clorobenciloxycarbonil-L-lisina
	13	BOC-L-triptófano
20	12	BOC-O-bencil-L-tirosina, BOC-L-tirosina o BOC-O-2-bromobenciloxycarbonil-L-tirosina
	11	BOC-L-alanina
	10	BOC-O-bencil-L-serina
25	9	BOC-L-leucina
	8	BOC-L-valina
	7	BOC-S-etiltio-L-cisteína, BOC-S-metiltio-L-cisteína, BOC-S-n-propiltio-L-cisteína o BOC-S-n-butiltio-L-cisteína
30		

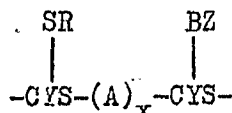
TABLA VIII (continuación)

<u>Número de posición</u>	<u>Aminoácido reaccionante</u>
6	BOC-O-bencil-L-treonina
5	BOC-O-bencil-L-serina
5	4 BOC-L-leucina
	3 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
10	BOC-S-3,4-dimetilbencil-L-cisteína.

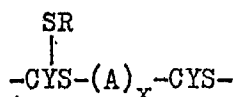
En la síntesis del péptido no cíclico obtenido por la serie de reacciones de la Tabla II y escisión de la resina, el grupo protector n-alquiltio se coloca en el resto de cisteína de la posición 6 y el grupo BZ se coloca en la primera posición. Se sobreentiende que al formar este péptido no cíclico, pueden invertirse esas posiciones, colocándose el grupo BZ en la posición 6 y el grupo n-alquiltio en la posición 1. Análogamente, con respecto a la Tabla III, los grupos protectores en las posiciones 7 y 1 pueden ser invertidos y lo mismo ocurre en las Tablas IV, VII y VIII. En cuanto a la Tabla V, los grupos protectores en las posiciones 6 y 1 pueden ser invertidos. En cuanto a la Tabla VI, que se refiere a la síntesis de la somatostatina, preferimos colocar el grupo n-alquiltio en la posición 14 y el grupo BZ en la posición 3, como se indica en dicha tabla. También en esta síntesis, preferimos utilizar una resina de poliestireno clorometilado en lugar de la resina de benzohidrilaminopoliestireno que es la preferida en la síntesis de las calcitoninas.

Los péptidos no cíclicos que contienen dos restos aminoácidos cisteína, que preparamos como intermediarios en nues

1 tro procedimiento, se caracterizan, antes de la escisión, por
contener la siguiente estructura:



5 y después de tratamiento ácido para separar los grupos pro-
tectores, por la estructura:



10 donde A es un resto aminoácido

x es 0 o un número entero

CYS es un resto de cisteína

R es un grupo n-alcuilo y

BZ es un grupo bencilo o derivado bencilico.

15 El péptido escindido contiene así un resto de cis-
teína con una función sulfhidrilo libre, participando la
función sulfhidrilo del otro resto de cisteína en un puente
de disulfuro con un grupo n-alcuilitio. Se observará que los
péptidos producidos como resultado de las reacciones de cada
una de las Tablas II a VIII pueden ser caracterizados así
20 cada uno de ellos.

25 Cualquier péptido que pueda ser caracterizado como
antes se ha indicado puede ser empleado como intermediario
en el procedimiento de esta invención y sometido a este pro-
ceso de cierre de anillo. Cualquiera de estos péptidos, con-
teniendo una estructura con dos restos cisteína, uno de los
cuales contiene una función sulfhidrilo libre y el otro con-
tiene una función sulfhidrilo bloqueada por un grupo n-alcuili-
tío, puede mantenerse en solución (cualquier solución en la
30 que sea soluble), prefiriéndose las soluciones acuosas o

1 alcohólicas, a un pH de 5 a 10 aproximadamente, hasta que experimenta una transposición espontánea al péptido deseado, que contiene cisteína y un grupo disulfuro cíclico, con desplazamiento del grupo n-alquilmercaptano.

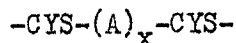
5 La reacción de transposición es facilitada ajustando el pH de la solución entre 5,0 y 8,5, preferiblemente entre 6,0 y 8,5 y todavía mejor alrededor de 7,5, por ejemplo por adición de hidróxidos de amonio o de metales alcalinos. Puede utilizarse un pH inferior a 6,0 pero la transposición
10 transcurre más lentamente de lo deseable y puede utilizarse un pH hasta 10,0 o 10,5 aproximadamente, pero cuando se emplea un pH superior a 8,5 aproximadamente, hay cierto peligro de pérdida de rendimiento.

15 Además, preferimos agitar la solución durante el periodo de la reacción de transposición que puede durar alrededor de 2 a 48 horas, pero habitualmente es completa en unas 24 horas. La reacción es facilitada agitando con un agitador rotatorio o de cualquier otra forma.

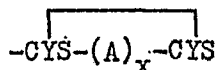
20 También hay que tener cuidado de evitar la presencia de oxígeno o de sustancias productoras de oxígeno y de mantener la solución esencialmente exenta de oxígeno. Es preferible colocar la solución que contiene el péptido bajo una corriente de un gas inerte como nitrógeno.

25 El n-alquilmercaptano que es desplazado como resultado de la reacción puede ser arrastrado por el nitrógeno o por otro gas inerte y cuando el gas está ya exento de mercaptano, puede considerarse que la reacción es completa.

30 El péptido intermedio que contiene la estructura



1 donde uno de dichos grupos CYS tiene una función sulfhidrilo
libre y el otro de dichos grupos CYS tiene unido un grupo
alquiltio a la función sulfhidrilo que participa en el puen-
te de disulfuro con el grupo sulfhidrilo al que protege, es
5 convertido por nuestro proceso de cierre de anillo en un pép-
tido en el que esta estructura se convierte en:



donde CYS es un resto de cisteína

10 A es un resto aminoácido y

x es 0 o un número entero.

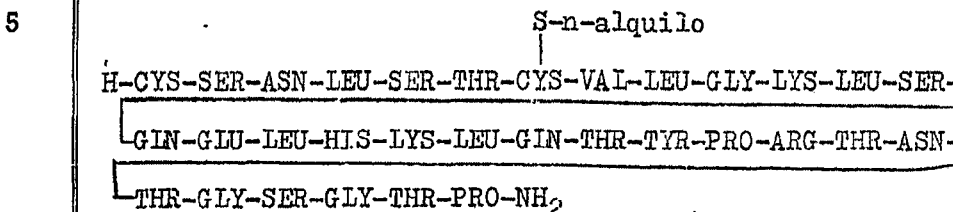
Si el procedimiento ha sido llevado a cabo cuidadosamen-
te de acuerdo con los procedimientos y precauciones antes in-
dicados, el cierre del anillo no produce ninguna otra altera-
15 ción en el péptido salvo la transposición para formar un puen-
te de disulfuro entre dos grupos cisteína y desplazar al n-
alquiltiomercaptano.

La solución de péptido obtenida mediante nuestro proce-
dimiento de cierre de anillo antes descrito puede ser purifi-
20 cada por procedimientos conocidos. La solución puede ser so-
metida a una combinación de procesos de filtración de gel y
métodos de cromatografía por cambio de ion. El producto puri-
ficado final puede ser obtenido de la solución por liofiliza-
ción. El péptido resultante resultará química y biológicamen-
25 te equivalente al péptido que ha sido obtenido de fuentes na-
turales.

Una aplicación de nuestro procedimiento mejorado es la
síntesis de la calcitonina de salmón que está descrita en
nuestra solicitud de patente copndiente estadounidense núme-
30 ro de serie 496.539, titulada "Síntesis de Calcitonina de

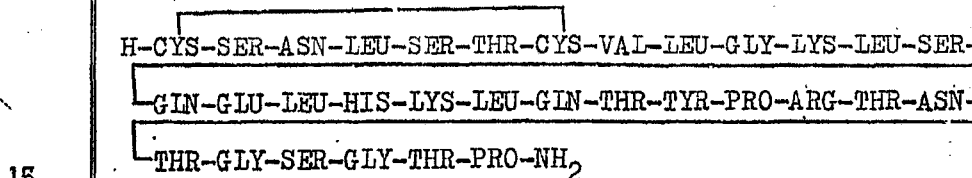


La fórmula de este péptido obtenido por escisión ácida anhidra se convierte en:



que es un precursor de la calcitonina de salmón.

10 Después de someter este péptido a nuestro método de ciclación mejorado aquí descrito, el péptido se convierte en:



que es la calcitonina de salmón.

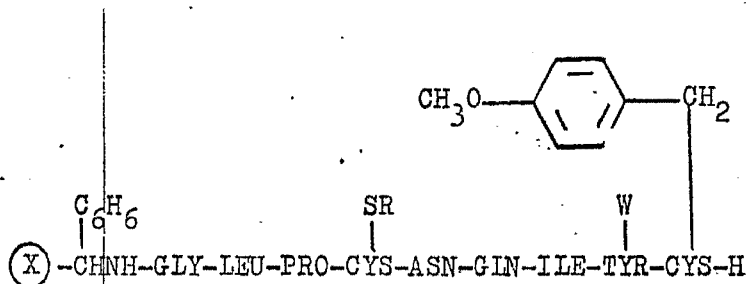
20 Otra aplicación de nuestro procedimiento mejorado es la síntesis de la oxitocina. La oxitocina contiene nueve aminoácidos y la cadena de aminoácidos de la oxitocina puede ser construída comenzando con la glicina en la posición 9. La glicina puede ser copulada a la resina BHA utilizando el reactivo BOC-glicina; después puede copularse la leucina utilizando el reactivo BOC-L-leucina y después se sigue utilizando ciclos de copulación y desprotección de acuerdo con la

25 técnica en fase sólida, utilizando consecutivamente los grupos aminoácidos especificados y los grupos protectores indicados en la Tabla II.

30 Cuando se llega a la posición 6, se utiliza un grupo protector n-alquiltio junto con el grupo cisteína y cuando se llega a la posición 1 y se copula otro grupo cisteína,

1 se emplea un grupo protector BZ. Alternativamente, el grupo protector BZ puede ser utilizado en la posición 6 y el grupo n-alquiltio en la posición 1.

5 Una vez completada la cadena de aminoácidos, el péptido puede escribirse así:

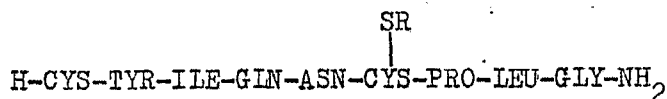


donde (X) es la porción de poliestireno de la resina

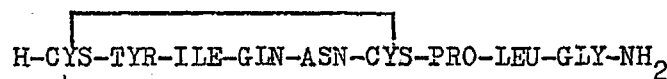
W es ningún grupo protector, un grupo BZ, un grupo benciloxicarbonilo o un grupo derivado del benciloxicarbonilo y

R es un grupo n-alquilo.

15 Después del tratamiento ácido para escindir la resina, este compuesto se convierte en:



25 Este péptido escindido, mientras todavía conserva el grupo n-alquiltio en la posición 6, cuando se mantiene en un disolvente, preferiblemente a pH 6,0 a 8,5, experimenta transposición del puente disulfuro entre la cisteína y su grupo protector n-alquiltio en la posición 6 y la posición sulfhidrilo de la cisteína en la posición 1, para dar el péptido descrito a continuación:



que es la oxitocina.

Un ejemplo específico de la síntesis de oxitocina uti-

1 lizando nuestro procedimiento mejorado se encuentra en el siguiente Ejemplo A.

EJEMPLO A

Síntesis de la oxitocina

5 Activación de la resina

En la vasiija de reacción de un sintetizador de péptidos vendido por Schwartz-Mann, Inc. de Orangeburg, New York, se introducen 5 g de resina de benzohidrilamina (BHA) con un título de amina de 0,43 miliequivalentes/g. La resina se trata con 20 ml de los siguientes disolventes, filtrando después de cada tratamiento:

10

cloruro de metileno - 2 minutos

cloroformo - 2 veces, 2 minutos cada vez.

15

triethylamina al 10 % en cloroformo - 2 veces, 5 minutos cada vez

cloroformo - 2 minutos

cloruro de metileno - 3 veces, 2 minutos cada vez

Ciclo 9.

20

Copulación: Se agitan durante 10 minutos la resina BHA, 20 ml de cloruro de metileno y 0,75 g (0,0043 moles) de BOC-glicina. Se añaden al reactor 4,3 ml de una solución en cloruro de metileno de dicitclohexilcarbodiimida (1 miliequivalente de DCCI por ml de solución) y la mezcla se agita durante 6 horas. La mezcla de reacción se saca del reactor por filtración y el BOC-glicil-resina BHA se somete a los siguientes lavados de 2 minutos, con 20 ml cada vez, separando las aguas de lavado por filtración cada vez:

25

cloruro de metileno - 2 veces

alcohol metílico - 2 veces

30

cloruro de metileno - 2 veces.

1 Acetilación: Después la resina se agita con una mezcla de 1,6 ml de anhídrido acético, 2,4 ml de trietilamina (TEA) y 20 ml de cloroformo, durante 30 minutos. La mezcla de reacción se separa por filtración y la resina se somete a los siguientes lavados de 2 minutos, empleando 20 ml cada vez:

 cloroformo - 2 veces
 alcohol metílico - 2 veces
 cloruro de metileno - 3 veces.

10 El ensayo con ninhidrina da resultado negativo.

Desprotección: La resina protegida con BOC se agita durante 5 minutos con una mezcla de 12 ml de ácido trifluoroacético (TFA) y 12 ml de cloruro de metileno. La mezcla se separa por filtración y la resina se agita con una segunda mezcla de 12 ml de TFA y 12 ml de cloruro de metileno, durante 30 minutos. La mezcla de reacción se separa por filtración y la resina se somete a los siguientes lavados con 20 ml:

 cloruro de metileno - 2 veces, 2 minutos cada vez
 alcohol metílico - 2 veces, 2 minutos cada vez
20 cloroformo - 2 veces, 2 minutos cada vez
 TEA al 10 % en cloroformo - 2 veces, 5 y 10 minutos
 cloroformo - 2 veces, 2 minutos cada vez
 cloruro de metileno - 2 veces, 2 minutos cada vez.

25 La L-glicina-resina BHA se valora (Dorman, L., Tetrahedron Letters, 1969, 2319-21) para establecer el título de amina o glicina. Este valor es de 0,384 miliequivalentes de amina o glicina por gramo de resina.

Ciclo 8

30 Copulación: Se agitan durante 10 minutos la resina-L-glicina, 20 ml de cloruro de metileno y 2,95 g (0,0038 moles)

1 de BOC-L-leucina.H₂O. Después se añaden al reactor 3,8 ml de
solución en cloruro de metileno de dicitclohexilcarbodiimida
(1 miliequivalente de DCCI por ml de solución o un total de
5 0,0038 moles de DCCI) y la mezcla se agita durante 2 horas. La
mezcla de reacción se saca del reactor y la resina se somete
a los siguientes lavados sucesivos de 2 minutos, con 20 ml cada
vez, separando las aguas de lavado por filtración cada vez:

cloruro de metileno - 2 veces

alcohol metílico - 2 veces

10 cloruro de metileno - 2 veces.

El ensayo con ninhidrina es negativo.

Desprotección: Se repite para este ciclo el procedimiento de desprotección descrito en el Ciclo 9.

Ciclo 7

15 Los procedimientos de copulación y desprotección utilizados en este ciclo son iguales que en el Ciclo 8, a excepción de que en lugar del derivado de leucina se emplea el siguiente derivado aminoácido:

0,82 g (0,0038 moles) de BOC-L-prolina.

20 Ciclo 6

Los procedimientos de copulación y desprotección utilizados en este ciclo son los mismos que en el Ciclo 8. El proceso de acetilación se realiza en este ciclo utilizando el mismo método que en el Ciclo 9. En el proceso de copulación se utiliza el siguiente derivado de aminoácido:

1,07 g (0,0038 moles) de BOC-S-etiltio-L-cisteína.

Ciclo 5

30 Copulación: El péptido-resina obtenido en el Ciclo 6 se lava dos veces con 20 ml cada vez de dimetilformamida (DMF). Después la resina se agita durante 24 horas con una so

1 lución de 2,01 g (0,0057 moles) de éster p-nitrofenílico de
BOC-L-asparagina en 25 ml de DMF. Se filtra la mezcla de reac-
ción y la resina-péptido se somete a lavados de 2 minutos con
5 2 porciones sucesivas de 20 ml de los siguientes disolventes:
dimetilformamida, cloruro de metileno, metanol y cloruro de
metileno. Los disolventes individuales de lavado se separan
por filtración. El ensayo con ninhidrina es negativo.

Desprotección: El procedimiento de desprotección uti-
lizado es el del Ciclo 8.

10

Ciclo 4

El procedimiento de copulación utilizado en este ci-
clo es el mismo del Ciclo 5. El procedimiento de acetilación
se realiza en este ciclo utilizando el mismo método que en
el Ciclo 9. El procedimiento de desprotección utilizado en
15 este ciclo es el mismo del Ciclo 8. Se utiliza el siguiente
derivado de aminoácido:

2,09 g (0,0057 moles) de éster p-nitrofenílico de BOC-
L-glutamina.

20

Ciclo 3

El procedimiento de copulación utilizado en este ciclo
es el mismo del Ciclo 8. Se repite la copulación utilizando un
sistema disolvente de 10 ml de dimetilformamida y 10 ml de clo-
ruro de metileno y las mismas cantidades de aminoácido y DCC.
El procedimiento de acetilación utilizado en este ciclo es el
25 mismo del Ciclo 9. El procedimiento de desprotección utiliza-
do en este ciclo es el mismo del Ciclo 8. En cada reacción de
copulación se utilizó el siguiente derivado de aminoácido:

0,88 g (0,0038 moles) de BOC-L-isoleucina.

30

Ciclo 2

Copulación: La resina-péptido obtenida en el Ciclo 3 se

1 lava con dos fracciones sucesivas de 20 ml de dimetilforma-
mida. La resina-péptido se agita después durante 10 minutos
con una mezcla de 2,11 g (0,0057 moles) de BOC-O-bencil-L-ti-
5 rosina y 20 ml de DMF. Después se añaden 5,7 ml de DCCI en
cloruro de metileno (equivalente a 0,0057 moles de DCCI) y la
mezcla se agita durante 16 horas. La mezcla de reacción se se-
para por filtración. La resina-péptido se somete a 2 minutos
de lavado con 2 porciones sucesivas de 20 ml de los siguien-
tes disolventes: dimetilformamida, cloruro de metileno, me-
10 tanol y cloruro de metileno.

Se repite la copulación utilizando la mitad de las can-
tidades del derivado de aminoácido y DCCI en cloruro de meti-
leno, durante un tiempo de agitación de 6 horas.

15 Acetilación: Se repite el procedimiento de acetilación
utilizado en el Ciclo 9.

Desprotección: Se repite el procedimiento de desprotec-
ción utilizado en el Ciclo 9.

Ciclo 1

20 El procedimiento de copulación utilizado en este ci-
clo es el mismo del Ciclo 8. La copulación se repite utilizan-
do la mitad del derivado de aminoácido y de DCCI en cloruro de
metileno. El procedimiento de desprotección utilizado en este
ciclo es el mismo del Ciclo 9. En la primera reacción de co-
25 pulación se utiliza la siguiente cantidad de derivado de ami-
noácido:

1,3 g (0,0038 moles) de BOC-S-metoxibencil-L-cisteína.

Una vez completado el Ciclo 1, la resina-péptido se
lava con 2 porciones sucesivas de 20 ml de n-hexano. El mate-
30 rial péptido se separa del reactor y se seca en una estufa
eléctrica a vacío, a 40°C y 0,1 mm Hg durante 24 horas. El

1 péptido-resina oxitocina bloqueada pesa 6,0 g.

Escisión con fluoruro de hidrógeno

5 En una vasiija de reacción de Teflon se introducen 2 g de la resina-péptido seca y 2 ml de anisol. La vasiija, provista de un agitador magnético revestido de Teflon, se introduce en un baño de acetona y hielo seco y se condensan en la vasiija 15 ml de fluoruro de hidrógeno gaseoso. Esta mezcla se agita a 0°C en un baño de hielo durante una hora. El fluoruro de hidrógeno se separa por evaporación a presión reducida. El residuo se tritura cuatro veces con 25 ml cada vez de acetato de etilo. El péptido se extrae de las perlas de resina con dos porciones de 50 ml cada una de ácido acético glacial. El extracto se liofiliza para dar 486 mg de péptido escindido.

Ciclación del péptido a oxitocina

15 Se disuelven parcialmente 200 mg del péptido crudo en 50 ml de agua destilada exenta de oxígeno a la que se ha añadido 1 ml de ácido acético glacial. El pH de la solución se ajusta a 7,5 por adición de hidróxido amónico concentrado. Esta mezcla se agita en una vasiija cerrada bajo una corriente de nitrógeno durante 24 horas. Al cabo de este tiempo no se puede detectar etilmercaptano en la corriente de nitrógeno efluente. El contenido en etilmercaptano en la corriente de nitrógeno se mide haciendo pasar la corriente a través de una solución de reactivo de Ellman : (Ellman, G.L. Arch. Biochem. Biophys., 20 82, 70-7 [1959]). La mezcla de reacción se ajusta a pH 3,2 por adición de ácido acético glacial. Se liofiliza para dar un residuo sólido.

Purificación de oxitocina cruda

30 Este residuo sólido se disuelve en una solución de ácido acético 0,5N y se purifica pasándolo a través de una co-

1 columna de filtración de gel Sephadex G-25 (fino) y se eluye con ácido acético 0,5N. La fracción de oxitocina de esta columna se recoge y liofiliza para dar 54 mg de un sólido blanco.

5 Este sólido se disuelve de nuevo en solución de ácido acético 0,5N y se purifica pasándolo por la columna de filtración de gel de Sephadex G-25 (fino) y eluyendo con solución de ácido acético 0,5N. La fracción de oxitocina de esta columna se recoge y liofiliza para dar un sólido blanco esponjoso. Este producto se analiza y se encuentran las siguientes relaciones de aminoácidos: GLY, 1,0; LEU, 0,98; PRO, 0,97; ASP, 0,89; GLU, 0,84; ILE, 0,74; TYR, 0,72. La cantidad teórica debe ser 1,0. No se indica el valor de CYS porque el método de ensayo destruye este aminoácido. La potencia biológica del producto es de 305,4 unidades/mg.

10

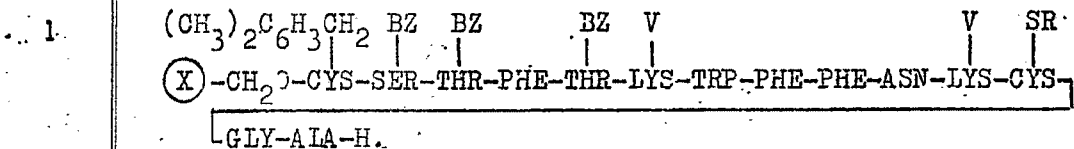
15

Nuestro procedimiento mejorado también puede ser aplicado de forma similar a la síntesis de la somatostatina. La resina puede ser la resina de poliestireno, tal como la resina de poliestireno clorometilada conocida en la técnica. La cisteína, en la posición 14, puede ser copulada primero a la resina utilizando como sustancia reaccionante la BOC-S-3,4-dimetilbencil-L-cisteína, después serina, después treonina, etc, empleando las sustancias reaccionantes que contienen los aminoácidos y los grupos protectores en la secuencia establecida en la Tabla VI. Cuando se llega a la posición 3, se utiliza el grupo cisteína con un grupo n-alquiltio. Cuando la cadena de aminoácidos ha sido completada y antes del tratamiento ácido para escindir la resina, la fórmula del péptido puede escribirse así:

20

25

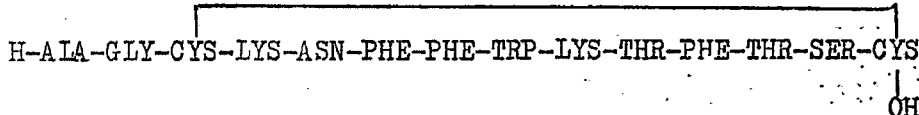
30



5 Después del tratamiento con ácido para escindir la resina, el péptido se convierte en:



10 Después de permitir que el péptido escindido no cíclico se transponga bajo las condiciones de nuestro procedimiento de ciclación, puede escribirse así:



15 Nuestro procedimiento mejorado puede ser aplicado a la síntesis de la calcitonina humana de forma similar a la descrita en relación con la calcitonina de salmón. La calcitonina humana contiene 32 aminoácidos en su cadena de aminoácidos. Partiendo de prolina, este aminoácido de la posición 32 se copula con la resina BHA, después se combinan la alanina en la posición 31 y la glicina en la posición 30 de acuerdo con el sistema de protección, copulación y desprotección anteriormente explicado, utilizando las sustancias reaccionantes, incluidos los grupos aminoácido y grupos protectores, indicados en la Tabla IV y en la secuencia indicada. Cuando se llega a los grupos de cisteína en las posiciones 7 y 1, se utiliza en una de estas posiciones un grupo protector n-alquiltio y en la otra posición, puede utilizarse el grupo habitual BZ.

20

25

30 Cuando se ha completado la cadena de aminoácidos, el péptido puede escribirse así (suponiendo que el grupo n-al-

1 ta con 20 ml de los siguientes disolventes filtrando después de cada tratamiento:

cloruro de metileno - 2 minutos

cloroformo - 2 veces, 2 minutos cada vez

5 trietilamina al 10 % en cloroformo - 2 veces, 5 minutos cada vez.

cloroformo - 2 minutos

cloruro de metileno - 3 veces, 2 minutos cada vez.

Ciclo 32

10 Copulación: Se agitan durante 10 minutos la resina BHA, 20 ml de cloruro de metileno y 0,95 g (0,0044 moles) de BOC-L-prolina. Se añaden al reactor 4,4 ml de solución en cloruro de metileno de diciclohexilcarbodiimida (1 miliequivalente de DCCI por ml de solución) y la mezcla se agita durante
15 6 horas. Se saca la mezcla de reacción del reactor por filtración y la BOC-prolil-resina BHA se somete a los siguientes lavados sucesivos durante 2 minutos, empleando 20 ml y separando las aguas de lavado por filtración cada vez:

20 cloruro de metileno - 2 veces

alcohol metílico - 2 veces

cloruro de metileno - 2 veces.

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

cloroformo - 2 veces

alcohol metílico - 2 veces

30 cloruro de metileno - 3 veces

1 El ensayo con ninhidrina es negativo (E. Kaiser y colaboradores, Anal. Biochem., 34, 595-8 [1970]).

5 Desprotección: La resina protegida con un grupo BOC se agita durante 5 minutos con una mezcla de 12,5 ml de ácido trifluoroacético (TFA) y 12,5 ml de cloruro de metileno. Esta mezcla se separa por filtración y la resina se agita con una segunda mezcla de 12,5 ml de TFA y 12,5 ml de cloruro de metileno durante 30 minutos. La mezcla de reacción se separa por filtración y la resina se somete a los siguientes lavados con 20 ml:

10 cloruro de metileno - 2 veces, 2 minutos cada vez

alcohol metílico - 2 veces, 2 minutos cada vez

cloroformo - 2 veces, 2 minutos cada vez

15 TEA al 10 % en cloroformo - 2 veces, 10 minutos cada vez

cloroformo - 2 veces, 2 minutos cada vez

cloruro de metileno - 2 veces, 2 minutos cada vez.

20 La L-prolina-resina BHA se valora para establecer el título de amina o prolina. Este valor es de 0,494 miliequivalentes de amina o prolina por gramo de resina.

Ciclo 31

25 Copulación: Se agitan durante 10 minutos la L-prolil-resina, 20 ml de cloruro de metileno y 0,83 g (0,0044 moles) de BOC-alanina. Después se añaden al reactor 4,4 ml de una solución en cloruro de metileno de biciclohexilcarbodiimida (1 miliequivalente de DCCI por ml de solución o un total de 0,0044 moles de DCCI) y la mezcla se agita durante 2 horas. Se saca la mezcla de reacción del reactor por filtración y la BOC-L-alanil-L-prolil-resina BHA se somete a los siguientes lavados sucesivos de 2 minutos, empleando 20 ml y

30

1 separando las aguas de lavado por filtración cada vez.

cloruro de metileno - 2 veces

alcohol metílico - 2 veces

cloruro de metileno - 3 veces.

5 El ensayo con ninhidrina es negativo.

Ciclos 30 a 26

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

10

Ciclo 30 - 0,77 g (0,0044 moles) de BOC-glicina

Ciclo 29 - 0,95 g (0,0044 moles) de BOC-L-valina

Ciclo 28 - El material utilizado es el mismo del Ciclo 30

15

Ciclo 27 - 1,02 g (0,0044 moles) de BOC-L-isoleucina

Ciclo 26 - El material utilizado es el mismo del Ciclo 31.

Ciclo 25

20

Copulación: La péptido-resina obtenida en el Ciclo 26 se lava dos veces con 20 ml cada vez de dimetilformamida (DMF). La resina-péptido se agita durante 10 minutos después con una mezcla de 2,04 g (0,0066 moles) de BOC-O-bencil-L-treonina y 20 ml de DMF. Después se añaden 6,6 ml de DCCI en cloruro de metileno (equivalente a 0,0066 moles de DCCI) y la mezcla se agita durante 6 horas. La mezcla de reacción se separa por filtración. La resina-péptido se somete a lavados de 2 minutos con 2 porciones sucesivas de 20 ml de los siguientes disolventes. Dimetilformamida, cloruro de metileno, alcohol metílico y cloruro de metileno. El ensayo con ninhidrina es negativo.

25

30

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

Ciclo 24

5 Copulación: La resina-péptido obtenida en el ciclo 25 se lava dos veces con 20 ml cada vez de dimetilformamida. Después la resina se agita durante 24 horas con una solución de 2,42 g (0,0066 moles) de éster p-nitrofenílico de BOC-L-glutamina en 25 ml de dimetilformamida. Se filtra la mezcla de reacción y la resina-péptido se somete a 2 minutos de lavado con 2 porciones sucesivas de 20 ml de los siguientes
10 disolventes: dimetilformamida, cloruro de metileno, metanol y cloruro de metileno. Cada disolvente individual se separa por filtración. El ensayo con ninhidrina es negativo.

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

Ciclo 23

20 Copulación: La resina-péptido obtenida en el Ciclo 24 se agita durante 10 minutos con 1,42 g (0,0066 moles) de BOC-L-prolina y 20 ml de cloruro de metileno. Se añaden 6,6 ml de DCCI en cloruro de metileno (equivalente a 0,0066 moles de DCCI) y la mezcla se agita durante 16 horas. La mezcla de reacción se separa por filtración y la resina-péptido se somete a lavados sucesivos de 2 minutos, con 2 porciones de
25 20 ml de los siguientes disolventes: cloruro de metileno, alcohol metílico y cloruro de metileno. Cada lavado individual se separa por filtración. El ensayo con ninhidrina es negativo.

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

1 Ciclo 22

5 Los procedimientos de copulación y desprotección utilizados en este ciclo son los mismos del Ciclo 23, a excepción de que, en la reacción de copulación, se emplean 1,75 g (0,0066 moles) de BOC-L-fenilalanina en lugar de BOC-L-prolina.

10 Ciclos 21 a 18

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

Ciclo 21 - 1,36 g (0,0044 moles) de BOC-O-bencil-L-treonina

15 Ciclo 20 - 1,71 g (0,0044 moles) de BOC-N(im)-carbociloxi-L-histidina

Ciclo 19 - 1,17 g (0,0044 moles) de BOC-L-fenilalanina

Ciclo 18 - 1,67 g (0,0044 moles) de BOC-ε-carbociloxi-L-lisina.

20 Ciclo 17

El procedimiento de copulación y desprotección utilizado en este ciclo es el mismo del Ciclo 24, a excepción de que se emplean 2,33 g (0,0066 moles) del éster p-nitrofenílico de BOC-L-asparagina en lugar del derivado de glutamina.

25 Ciclos 16 y 15

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

30 Ciclo 16 - 1,17 g (0,0044 moles) de BOC-L-fenilalanina

1

Ciclo 15 - 1,42 g (0,0044 moles) de éster β -bencílico de ácido BOC-L-aspartico.

Ciclo 14

Igual que el Ciclo 24.

5

Ciclo 13

Igual que el Ciclo 21.

Ciclo 12

10

El procedimiento de copulación y desprotección utilizado en este ciclo es el mismo del Ciclo 25, a excepción de que se emplean 2,45 g (0,0066 moles) de BOC-O-bencil-L-tirosina en lugar del derivado de treonina y que el tiempo de agitación se prolonga a 16 horas.

Ciclo 11

Igual que el Ciclo 25.

15

Ciclos 10 a 7

Los procedimientos de copulación y desprotección utilizados en estos ciclos son iguales a los del Ciclo 31, a excepción de que en la reacción de copulación se emplean los siguientes derivados de aminoácidos en lugar de la BOC-L-alanina:

20

Ciclo 10 - 0,77 g (0,0044 moles) de BOC-glicina

Ciclo 9 - 1,02 g (0,0044 moles) de BOC-L-leucina

Ciclo 8 - 1,1 g (0,0044 moles) de BOC-L-metionina

Ciclo 7 - 1,24 g (0,0044 moles) de BOC-S-etiltio-L-cisteína.

25

Ciclo 6

Igual que el Ciclo 25.

Ciclos 5 y 4

30

Los procedimientos de copulación y desprotección utilizados en estos ciclos son los mismos que en el Ciclo 31, a

1 excepción de que en la reacción de copulación se emplean los
siguientes derivados de aminoácidos en lugar de la BOC-L-ala-
nina:

5 Ciclo 5 - 1,3 g (0,0044 moles) de BOC-O-bencil-L-se-
rina

Ciclo 4 - 1,02 g (0,0044 moles) de BOC-L-leucina

Ciclo 3

Igual que el Ciclo 17.

Ciclos 2 y 1

10 Los procedimientos de copulación y desprotección uti-
lizados en estos ciclos son los mismos que en el Ciclo 31,
a excepción de que en la reacción de copulación se emplean
los siguientes derivados de aminoácidos en lugar de la BOC-L-
alanina:

15 Ciclo 2 - 0,77 g (0,0044 moles) de BOC-glicina

Ciclo 1 - 1,5 g (0,0044 moles) de BOC-S-p-metoxiben-
cil-L-cisteína

20 Una vez completado el Ciclo 1, la resina-péptido se
lava dos veces sucesivas con 20 ml cada vez de n-hexano. El ma-
terial péptido se saca del reactor y se seca en una estufa
eléctrica a vacío, a 40°C y 0,1 mm Hg durante 24 horas. La
resina-péptido calcitonina humana bloqueada pesa 11 g.

Escisión con fluoruro de hidrógeno

25 Se introducen 2 g de la resina-péptido seca y 2 ml
de anisol en una vasiija de reacción de Teflon. La vasiija, pro-
vista de un agitador magnético revestido de Teflon, se intro-
duce en un baño de acetona y hielo seco y se condensan en la
vasiija 15 ml de fluoruro de hidrógeno gaseoso. Esta mezcla se
30 agita a 0°C en un baño de hielo durante una hora. El fluoruro
de hidrógeno se separa por evaporación a presión reducida. El

1 residuo se tritura con 4 porciones de 25 ml cada una de acetato de etilo. El péptido se extrae de las perlas de resina con 2 porciones de 50 ml cada una de ácido acético glacial. El extracto se liofiliza para dar 1063 mg de péptido escindido.

5 Ciclación del péptido a calcitonina humana

Se disuelven 1000 mg de péptido crudo en 250 ml de agua destilada exenta de oxígeno a la que se ha añadido 1 ml de ácido acético glacial. El pH de la solución se ajusta a 7,5 por adición de hidróxido amónico concentrado. Esta mezcla se agita en una vasiija cerrada bajo una corriente de nitrógeno durante 24 horas. En este momento, ya no se detecta etilmercaptano en la corriente efluente de nitrógeno. El contenido en etilmercaptano de la corriente de nitrógeno se mide haciendo pasar la corriente a través de una solución de reactivo de Ellman, (Ellman, G.L., Arch. Biochem. Biophys., 82, 70-7 (1959)). El pH de la mezcla de reacción se ajusta a 3,2 por adición de ácido acético glacial. Por liofilización se obtiene un producto sólido que pesa 985 mg.

15 Purificación de la calcitonina humana cruda

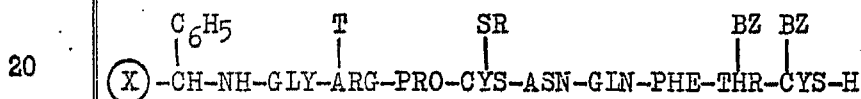
20 El producto sólido se disuelve en ácido acético 0,5N y se purifica pasándolo por una columna de filtración de gel Sephadex G-25 (fino) y se eluye con ácido acético 0,5N. La fracción de calcitonina humana de esta columna se recoge y liofiliza para dar un sólido blanco esponjoso.

25 Este sólido blanco esponjoso se disuelve en acetato amónico acuoso 0,05M (pH 5). La solución se ajusta a pH 5 y se purifica por cromatografía de cambio de ion, utilizando una columna SP-Sephadex C-25 eluida con solución reguladora de acetato amónico. La fracción de calcitonina humana se recoge y liofiliza dos veces para dar un sólido blanco esponjoso. Se

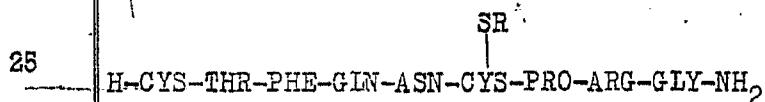
30

1 encuentra que este material es biológica y químicamente equi-
valente al producto citado en la bibliografía (Sieber, P.
y colaboradores, Helv.Chim. Acta 53, 2135-50 [1970]). El análi-
sis de aminoácidos (hidrólisis ácida) dió las siguientes pro-
5 porciones de aminoácidos (el resultado teórico se da entre
paréntesis): LYS 1,02 (1), HIS 0,99 (1), ASP 3,28 (3), THR
5,21 (5), SER 0,74 (1), GLU 1,95 (2), GLY 4,33 (4), ALA
2,03 (2), VAL 1,04 (1), MET 0,86 (1), ILE 1,07 (1), LEU 2,24
(2), TYN 0,7 (1), PHE 3,0 (3). Los valores de PRO y CYS no se
10 determinaron. Se encontró que la actividad biológica era de
100 unidades MRC por miligramo.

Análogamente, nuestro procedimiento mejorado puede ser
aplicado a la síntesis de la vasopresina utilizando como sus-
tancias reaccionantes en la posición 9 de la cadena de amino-
15 ácidos los grupos indicados en la Tabla V o sus equivalentes.
La fórmula del péptido resultante de las reacciones citadas
en la Tabla V y antes de la escisión de la resina, puede es-
cribirse así:

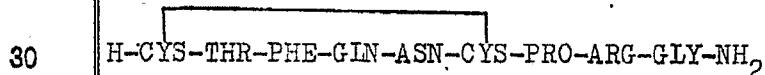


Después del tratamiento con ácido de este péptido pa-
ra separar la resina y la mayoría de los grupos protectores,
la fórmula se convierte en:

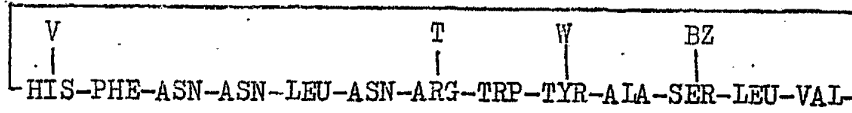
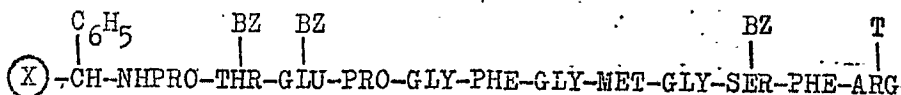


que es un precursor de la vasopresina.

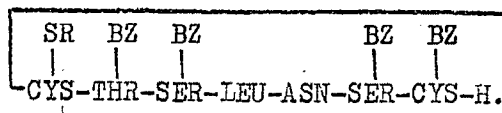
Después de someter este péptido a nuestro método de
ciclación mejorado aquí descrito, el péptido se convierte en:



1

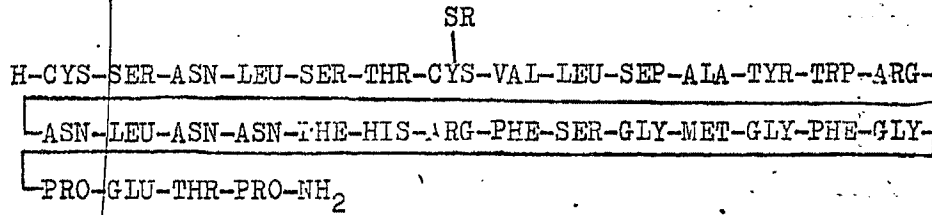


5



Después del tratamiento con ácido de este péptido para escindir la resina y la mayoría de los grupos protectores, la fórmula se convierte en:

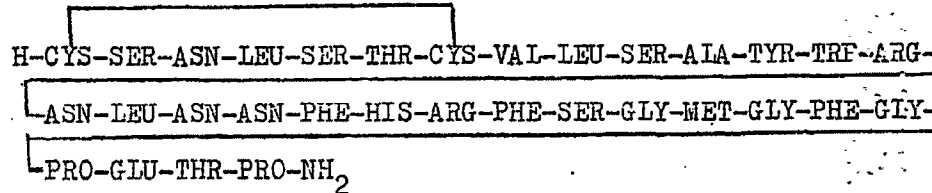
10



que es un precursor de la calcitonina porcina.

15

Después de someter este péptido a nuestro método de ciclación mejorado aquí descrito, el péptido se convierte en:



20

que es la calcitonina porcina.

Para aplicar el procedimiento mejorado a la síntesis de la calcitonina bovina, la cadena de aminoácido de la calcitonina bovina puede ser construída utilizando las sustancias reaccionantes indicadas en la Tabla VIII o sus equivalentes. La fórmula del péptido resultante de las reacciones ilustradas en la Tabla VIII y antes de la escisión de la resina, puede escribirse así:

25

30

Nº 440.922

REIVINDICACIONES

1
5
10
15
20
25
30

1.- Un procedimiento para la preparación de un péptido con una estructura cíclica de disulfuro, caracterizado por la operación de mantener un péptido no cíclico, que contiene por lo menos dos radicales de cisteína en su cadena de aminoácidos, uno de los cuales contiene una función sulfhidrilo libre y el otro tiene su función sulfhidrilo protegida por un grupo n-alquiltio que participa en un enlace disulfuro con la función tiol del otro radical citado, en una solución esencialmente exenta de oxígeno hasta que ha tenido lugar la transposición para formar el péptido disulfuro cíclico.

2.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el cual dicho péptido no cíclico es mantenido en dicha solución preferiblemente a un pH de 5 a 10 aproximadamente.

3.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicha solución es una solución acuosa.

4.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicha solución es una solución hidroalcohólica.

5.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que dicho grupo alquilo en el grupo n-alquiltio citado es etilo, metilo, propilo o butilo.

6.- Un procedimiento según la Reivindicación 5, en el que dicho grupo alquilo es etilo.

7.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, que incluye la operación de agitar dicha solución durante la transposición mencionada.

8.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde la transposición se efectúa bajo una corriente de gas inerte.

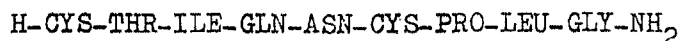
1

9.- Un procedimiento según la Reivindicación 8, donde el gas inerte es nitrógeno.

5

10.- Un procedimiento según la Reivindicación 8, donde se continúa el proceso hasta que el gas que ha pasado sobre dicha solución está esencialmente exento de mercaptano.

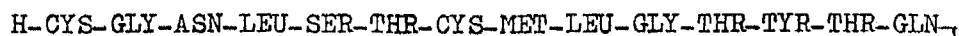
11.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde el péptido no cíclico citado es



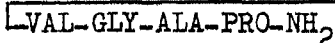
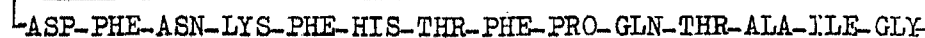
10

donde uno de los grupos CYS allí contenidos lleva unido un grupo -S-n-alkilo.

12.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde dicho péptido no cíclico es



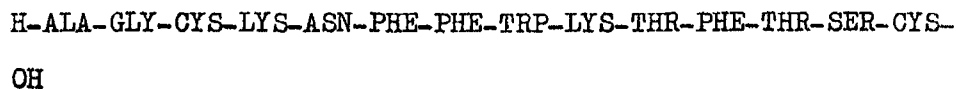
15



donde uno de los grupos CYS allí contenidos lleva unido un grupo -S-n-alkilo.

20

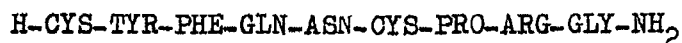
13.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde dicho péptido no cíclico es



donde uno de los grupos CYS allí contenidos lleva unido un grupo -S-n-alkilo.

25

14.- Un procedimiento según la Reivindicación 1, donde dicho péptido no cíclico es



donde uno de los grupos CYS allí contenido lleva unido un grupo -S-n-alkilo.

30

15.- Un procedimiento según la Reivindicación 1,

1 donde la preparación de dicho péptido no cíclico comprende
las operaciones de copular un radical de cisteína en una
cadena de aminoácidos mientras se protege la función sulfhi
5 drilo de dicho radical con un grupo BZ y copular otro radi-
cal de cisteína en dicha cadena mientras se protege la fun-
ción sulfhidrilo de dicho otro radical con un grupo n-al-
quiltio y tratar el péptido así formado con un ácido anhi-
dro para escindir dicho grupo BZ dejando unido dicho grupo
10 n-alquiltio, siendo el grupo BZ bencilo o un derivado de
bencilo.

16.- Un procedimiento según la Reivindicación 15,
donde dicha cadena incluye la siguiente secuencia de radi-
cales de aminoácidos:

CYS-TYR-ILE-GLN-ASN-CYS-PRO-LEU-GLY.

15 17.- Un procedimiento según la Reivindicación 15,
donde dicha cadena incluye la siguiente secuencia de radi-
cales de aminoácidos:

CYS-GLY-ASN-LEU-SER-THR-CYS-MET-LEU-GLY-THR-TYR-THR-GLN-

18-ASP-PHE-ASN-LYS-PHE-HIS-THR-PHE-PRO-GLN-THR-ALA-ILE-GLY-

20 VAL-GLY-ALA-PRO.

18.- Un procedimiento según la Reivindicación 15,
donde dicha cadena incluye la siguiente secuencia de radi-
cales de aminoácidos:

ALA-GLY-CYS-LYS-ASN-PHE-PHE-TRP-LYS-THR-PHE-THR-SER-CYS.

25 19.- Un procedimiento según la Reivindicación 15,
donde el grupo alquilo de dicho grupo n-alquiltio es etilo,
metilo, propilo o butilo.

20.- Un procedimiento según la Reivindicación 19,
donde dicho grupo alquilo es etilo.

30 21.- Se reivindica por último como objeto sobre

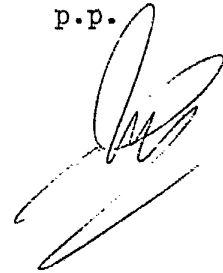
1 el que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita
UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN PEPTIDO CON UNA
ESTRUCTURA CICLICA DE DISULFURO.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en
la presente memoria descriptiva que consta de cincuenta y
una páginas mecanografiadas.

Madrid 12 septiembre 1975

BERNARDO UNGRIA

P.P.



10

15

20

25

30