



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 08 G 69/10

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ PATENTSCHRIFT A5

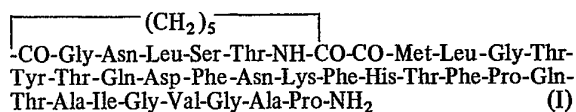
⑪

633 566

②① Gesuchsnummer:	13733/77	⑦③ Inhaber:	Toyo Jozo Kabushiki Kaisha, Tagata-gun/Shizuoka-ken (JP)
②② Anmeldungsdatum:	10.11.1977		
③③ Priorität(en):	11.11.1976 JP 51-134677	⑦② Erfinder:	Shumpei Sakakibara, Suita-shi/Osaka-fu (JP) Tadanori Morikawa, Kadoma-shi/Osaka-fu (JP) Yasuo Nakagawa, Nishinomiya-shi/Hyogo-ken (JP)
②④ Patent erteilt:	15.12.1982		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	15.12.1982	⑦④ Vertreter:	Fritz Isler, Patentanwaltsbureau, Zürich

⑤④ Verfahren zur Herstellung eines neuen Polypeptides mit Serumcalcium herabsetzender Wirksamkeit.

⑤⑦ Das neue Polypeptid der Formel



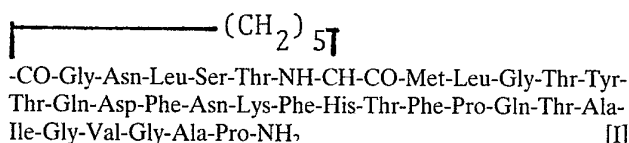
und dessen pharmazeutisch annehmbare Säureadditionssalze weisen eine Serumcalcium herabsetzende Wirksamkeit auf. Die Verbindung wird aus den in der Formel in Erscheinung tretenden Aminosäuren und/oder Peptiden in der Reihenfolge der Aminosäuresequenz der Formel aufgebaut und die Peptideinheit, welche die Gruppe



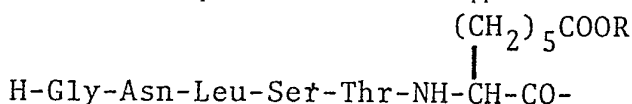
enthält, in welcher R einen reaktionsfähigen Ester darstellt, in jeder beliebigen Stufe der Reaktion einer Ringschlussreaktion unterworfen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines neuen Polypeptides mit Serumcalcium herabsetzender Wirksamkeit der Formel I

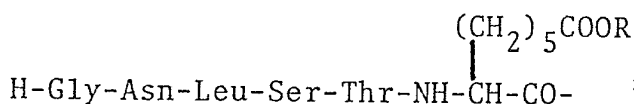


oder dessen pharmazeutisch annehmbaren Säureadditionssalzen, dadurch gekennzeichnet, dass man aus den in der Verbindung der Formel I in Erscheinung tretenden Aminosäuren und/oder Peptiden aus mindestens 2 bis 4 Aminosäuren in der Reihenfolge der Aminosäuresequenz der Formel I ein Peptid aufbaut und die Peptideinheit, welche die Gruppe



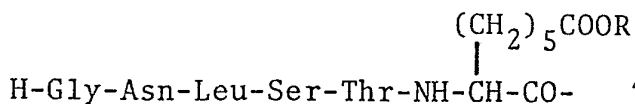
enthält, in welcher R einen reaktionsfähigen Esterrest darstellt, in jeder beliebigen Stufe der Reaktion einer Ringschlussreaktion unterwirft.

2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptideinheit, welche die Gruppe



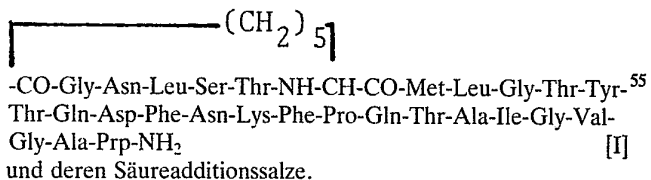
enthält, in welcher R dieselbe Bedeutung wie oben aufweist, während der Bildung der Peptideinheit, welche die α -Aminokorksäureeinheit enthält, der Ringschlussreaktion unterwirft.

3. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Peptideinheit, welche die Gruppe



enthält, in welcher R dieselbe Bedeutung wie oben aufweist, während der Bildung der Peptideinheit, welche die α -Aminokorksäureeinheit enthält, der Ringschlussreaktion unterwirft, wobei mindestens eine Aminogruppe oder Carboxylgruppe in der Verbindung durch eine Schutzgruppe geschützt ist, und diese Schutzgruppe entfernt wird.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines neuen Polypeptides der Formel I



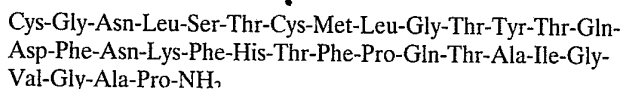
und deren Säureadditionssalze.

Das Polypeptid der Formel I weist Serumcalcium herabsetzende Wirksamkeit auf.

Calcitonin ist ein bekanntes Polypeptid, welches Serumcalcium herabsetzende Wirksamkeit bei Säugetieren aufweist und aus der Schilddrüse von Säugetieren oder dem letzten Branchialkörper (ultimo branchial body) von Vögeln oder Fischen isoliert wird. Die Folge der Aminosäuren in Calcitonin hängt vom Ursprung der Arten ab, und synthetische Calcitonine mit derselben chemischen Struktur wie diejenigen natürlichen Ursprungs wurde vor kurzem bekannt.

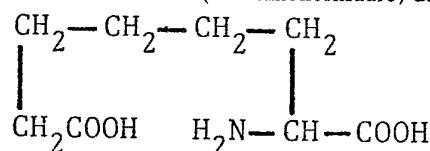
Die Calcitonine natürlichen Ursprungs, wie Aal-, Salm-, oder menschliches Calcitonin sind Polypeptide, welche aus 32 Aminosäuren bestehen, wobei die erste und siebte Aminosäure L-Cystein ist und die Mercaptogruppe davon unter Bildung einer Disulfidbrücke gebunden ist, und wobei die endständige Carboxylgruppe Prolinamid ist. Diese Calcitonine weisen eine andere Aminosäurefolge und eine Wirksamkeit auf.

Die Aminosäurefolge von menschlichem Calcitonin ist die folgende:



Die Disulfidbindung in diesem Calcitonin ist chemisch sehr instabil und kann leicht zersetzt oder polymerisiert werden, und aus diesem Grunde ist die chemische Synthese von diesem natürlichen menschlichen Calcitonin sehr schwierig. Auch ist die Stabilität als pharmazeutische Verbindung sehr gering.

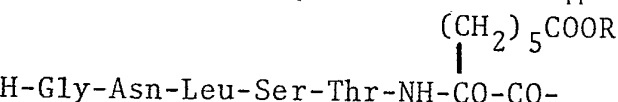
Das neue Polypeptid der Formel I weist weder als erste noch als siebte Aminosäure L-Cystein auf und das L-Cystein ist ersetzt durch α -Aminosuberinsäure (α -Aminokorksäure) der Formel:



Die Carboxylgruppe in ω -Stellung ist mit Glycin zu einer Ringstruktur verbunden.

Das Polypeptid der Formel I weist eine zehnmal höhere biologische Wirksamkeit als das natürliche menschliche Calcitonin auf und ist chemisch sehr stabil. Das Polypeptid I weist ferner dieselbe Aminosäure-Sequenz wie das menschliche Calcitonin an den Fragmenten 11 bis 32 auf, eine antigene Determinante für die Gegenreaktion mit Antiserum von Calcitonin [Europ. J. Clin. Invest., 4, 213 bis 222 (1974)]. Das Polypeptid I ist daher immunologisch identisch mit dem natürlichen menschlichen Calcitonin und ist daher pharmazeutisch sehr sicher und weist keine Gegenimmunität mit Calcitonin von Schweinen oder Salm auf.

Die Verbindung der Formel I wird hergestellt, indem man aus den in der Verbindung der Formel I in Erscheinung tretenden Aminosäuren und/oder Peptiden aus mindestens 2 bis 4 Aminosäuren in der Reihenfolge der Aminosäuresequenz der Formel I ein Peptid aufbaut und die Peptideinheit, welche die Gruppe



enthält, in welcher R einen reaktionsfähigen Esterrest darstellt, in jeder beliebigen Stufe der Reaktion einer Ringschlussreaktion unterwirft. Allfällige Schutzgruppen für die reaktionsfähigen Gruppen können in jeder gewünschten Stufe der Reaktion entfernt werden. Falls erwünscht, kann das Produkt in seine Säureadditionssalze oder Komplexe übergeführt werden.

Die Schutzgruppen für die Synthese der Ausgangsmaterialien oder Zwischenstufen sind übliche Schutzgruppen für die Peptidsynthese und sollten durch Hydrolyse, Säurezersetzung, Reduktion, Aminolyse oder Hydrazinolyse leicht entfernbar sein.

Beispielsweise können die Aminogruppen auf übliche Weise geschützt werden durch eine Acylgruppe, wie die Formyl-, Trifluoracetyl-, Phthaloyl-, Benzolsulfonyl-, p-Toluolsulfonyl-, o-Nitrophenylsulfonyl- oder 2,4-Dinitrophenylsulfonylgruppe, eine Aralkylgruppe, wie z. B. die Benzyl-, Diphenylmethyl- oder Triphenylmethylgruppe (diese Gruppen können gegebenenfalls mit einer niederen Alkoxygruppe, wie der o-Methoxy- oder p-Methoxygruppe substituiert sein), eine Benzyloxycarbonylgruppe, wie die Benzyloxycarbonyl-, o-Brombenzyloxycarbo-

nyl-, p-Brombenzyloxycarbonyl-, o-Chlorbenzyloxycarbonyl-, p-Nitrobenzyloxycarbonyl-, p-Methoxybenzyloxycarbonyl-, p-Phenylazo-benzyloxycarbonyl- oder p-(p'-Methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonylgruppe, eine aliphatische Oxycarbonylgruppe, wie die Cyclopentylloxycarbonyl-, Trichloräthylloxycarbonyl-, t-Amyloxycarbonyl-, t-Butoxycarbonyl- oder Diisopropylmethoxycarbonylgruppe, oder eine Aralkyloxycarbonylgruppe, wie die 2-Phenylisopropoxycarbonyl-, 2-Toryl-isopropoxycarbonyl- oder 2-p-Diphenyl-isopropoxycarbonylgruppe. Diese Aminogruppen können geschützt werden durch Enaminbildung durch Umsetzung mit 1,3-Diketon, wie Benzoylacetone, Acetylacetone oder Dimedone.

Die Carboxylgruppe kann geschützt werden durch Amidbildung, Hydrazidbildung oder Veresterung. Die Amidgruppe wird mit einer 3,4-Dimethoxybenzyl- oder Bis-(p-methoxyphenyl)-methylgruppe substituiert. Die Hydrazidgruppe ist substituiert mit einer Benzyloxycarbonyl-, Trichloräthylloxycarbonyl-, Trifluoracetyl-, t-Butoxycarbonyl-, Trityl- oder 2-p-Diphenyl-isopropoxycarbonylgruppe. Die Estergruppe ist substituiert mit einem Alkanol, wie Methanol, Äthanol, t-Butanol oder Cyanomethylalkohol; einem Aralkanol, wie Benzylalkohol, p-Brombenzylalkohol, p-Chlorbenzylalkohol, p-Methoxybenzylalkohol, p-Nitrobenzylalkohol, 2,4,6-Trimethylbenzylalkohol, Benzhydrylalkohol, Benzoylmethylalkohol, p-Brombenzoylmethylalkohol oder p-Chlorbenzoylmethylalkohol; einem Phenol wie 2,4,6-Trichlorphenol, 2,4,5-Trichlorphenol, Pentachlorphenol, p-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol, p-Cyanphenol oder p-Methansulfonylphenol; oder einem Thiophenol, wie Thiophenol, Thiocresol oder p-Nitrothiophenol. Die Hydroxygruppe in Serin, Threonin oder Tyrosin kann gegebenenfalls durch Veresterung oder Verätherung geschützt werden. Eine durch Veresterung geschützte Gruppe ist zum Beispiel eine niedere Alkanoylgruppe, wie eine Acetylgruppe; eine Aroylgruppe, wie eine Benzoylgruppe oder eine von einem Carbonyl abgeleitete Gruppe, wie Benzyloxycarbonyl oder Äthylloxycarbonyl. Ein durch Verätherung geschützte Gruppe ist zum Beispiel eine Benzyl-, Tetrahydropyranyl- oder t-Butylgruppe. Der Schutz der Hydroxygruppe kann mit einer 2,2,2-Trifluor-1-t-butyloxycarbonylaminoäthyl- oder 2,2,2-Trifluor-1-benzyloxycarbonylaminoäthylgruppe erfolgen. Es ist jedoch nicht immer notwendig, diese Hydroxygruppen zu schützen.

Die Iminogruppe in Histidin kann geschützt werden durch eine Benzyl-, Trityl-, Benzyloxycarbonyl-, Tosyl-, Adamantylloxycarbonyl-, 2,2,2-Trifluor-1-t-butyloxycarbonylaminoäthyl- oder 2,2,2-Trifluor-1-benzyloxycarbonylaminoäthylgruppe, jedoch erfordert die Iminogruppe nicht immer einen derartigen Schutz.

Die Peptide der Ausgangsmaterialien oder Zwischenprodukte werden üblicherweise durch Kondensation von Aminosäuren oder Peptiden – vorzugsweise 2 bis 4 Aminosäuren – in der Reihenfolge der Aminosäuresequenz der Formel I synthetisiert. Beispielsweise wird eine Aminosäure oder ein Peptid mit geschützter α -Aminogruppe und aktivierter endständiger Carboxylgruppe mit einer Aminosäure oder einem Peptid mit freier α -Aminogruppe und geschützter endständiger Carboxylgruppe umgesetzt. Andererseits wird eine Aminosäure oder ein Peptid mit aktivierter α -Aminogruppe und geschützter endständiger Carboxylgruppe mit einer Aminosäure oder einem Peptid mit freier endständiger Carboxylgruppe und geschützter α -Aminogruppe umgesetzt.

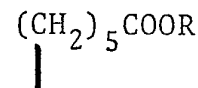
Die Carboxylgruppe kann aktiviert werden, z. B. durch Umwandlung in ein Säureazid, Säureanhydrid, Säureimidazol oder einen aktiven Ester, wie durch Umwandlung in Cyanomethylester, Thiophenylester, p-Nitrophenylester, p-Nitrothiophenylester, p-Methansulfonylphenylester, Thiodylester, 2,4-Dinitrophenylester, 2,4,5-Trichlorphenylester, 2,4,6-Trichlorphenylester, Pentachlorphenylester, N-Hydroxysuccinimidester, N-Hydroxyphthaliminoester, 8-Hydroxychinolinester oder N-

Hydroxypiperidinester, Carbodiimid, N,N'-Carbonyl-diimidazol oder ein Isoxazoliumsalz, wie Woodward-Reagens.

Die Carboxylgruppe kann auf übliche Weise aktiviert werden, z. B. durch Umwandlung in ein Säureazid, ein Säureanhydrid, einen aktiven Ester oder Carbodiimid.

Bevorzugte Kondensationsreaktionen sind die Wünsch-Methode, die Azide, Aktivester- oder Geiger-Methode. Bei der Kondensationsreaktion sollte eine Racemisierung sorgfältig vermieden werden.

10 Die Aufbaueinheit, welche das derart erhaltene Peptid der Formel



15 H-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-NHCHCO-

enthält, in welcher R dieselbe Bedeutung wie oben aufweist, wird der Ringbildung unterworfen. Die Ringbildung wird durch eine Kondensationsreaktion mit der aktivierten ω -Carboxylgruppe in α -Aminokorksäure und der freien Aminogruppe in endständiger N-Aminosäure durchgeführt. Während der Kondensationsreaktion wird die Hydroxylgruppe von Serin und Threonin mit Vorteil geschützt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine Kondensationsreaktion mit einem Peptidring (welcher gegebenenfalls geschützte aktive Gruppen enthält), welcher α -Aminokorksäure enthält und dem restlichen anderen grossen Peptid, welches gegebenenfalls geschützte aktive Gruppen aufweist, durchgeführt. Das heisst, das N-endständige Fragment bestehend aus der 1. 6.–9. Aminosäure wird mit dem restlichen Peptid der ganzen Folge der 7.–10. bis 31. Aminosäure kondensiert. Um die Reaktionsfähigkeit der beiden Fragmente bei der Kondensation zu fördern und eine Racemisierung zu verhindern wird vorzugsweise Glycerin als C-endständige Aminosäure verwendet.

In der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise ein Peptid, welches aus der 1.–9. Aminosäurefolge besteht, mit einem Peptid umgesetzt, welches aus der 10.–31. Aminosäure besteht.

Diese Kondensationsreaktion kann durchgeführt werden, indem man von dem Peptid mit einer freien endständigen Carboxylgruppe nach der sogenannten Wünsch-Methode ausgeht, oder nach der Aktivestermethode. Sie kann vorzugsweise jedoch auch nach der Azid-Methode erfolgen, welche von einem Peptid mit einer endständigen Azid- oder Hydrazidgruppe ausgeht, oder nach der gemischten Anhydrid-Methode.

Die Synthese des N-endständigen Fragmentes, wie eines Nonapeptides bestehend aus der 1.–9. Aminosäurefolge wird nun im Detail beschrieben, jedoch können auch das Hexapeptid 1–6, das Heptapeptid 1–7 oder das Octapeptid 1–8 im wesentlichen nach derselben Methode erhalten werden.

Die Nonapeptidsequenz kann erzeugt werden durch Verbinden jeder Aminosäure mit niederem Peptid, bestehend aus 2 bis 4 Aminosäuren in der Reihenfolge der Aminosäuresequenz von der C-endständigen Aminosäure ausgehend. Eine Aminosäure, wie Glycin, Leucin, α -Aminokorksäure, Threonin, Methionin, Serin oder Asparagin wird vorzugsweise nach der Aktivestermethode kondensiert. Das niedere Peptid, wie Tripeptid 2–4, wird vorzugsweise nach der Geiger-Methode oder der Wünsch-Methode kondensiert.

Bei der Kondensationsreaktion mit Hilfe der Azid-, Aktivester- oder Säureanhydridmethode ist es nicht notwendig, die endständige Carboxylgruppe in Nonapeptid zu schützen. Die Carboxylgruppe kann jedoch durch Veresterung mit einem Alkohol, wie Methanol, Benzylalkohol oder anderen Alkoholen geschützt werden. Die Estergruppe, wie die Methylestergruppe, kann mit verdünnter Natriumhydroxidlösung oder durch Umwandlung in das Hydrazid entfernt werden und die Benzylestergruppe kann durch katalytische Hydrierung entfernt werden.

Die Aminogruppe des Zwischenproduktes wird durch eine übliche Schutzgruppe geschützt, wie z. B. einer Benzyloxycarbonyl-, Trityl-, t-Butoxycarbonyl- oder 2-p-Diphenyl-isopropoxycarbonylgruppe. Die Carboxylgruppe kann, falls notwendig, durch übliche Veresterung geschützt werden. Die Hydroxylgruppe in Serin und Threonin kann, falls notwendig, durch Veresterung unter Verwendung von t-Butanol, Benzylalkohol oder einem anderen Alkohol geschützt werden.

Die Benzyloxycarbonyl-, p-Nitrobenzylester- und Benzylestergruppe können durch katalytische Hydrierung in Gegenwart von Palladium auf Kohle entfernt werden. Die N-Tritylgruppe wird mit wässriger Essigsäure abgespalten und die t-Butoxycarbonylgruppe kann mit Trifluoressigsäure entfernt werden. Die o-Nitrophenylsulfenylgruppe wird mit Chlorwasserstoff, Cyanwasserstoff oder schwefeliger Säure in einem organischen Lösungsmittel abgespalten. Die Diphenylisopropoxycarbonylgruppe wird mit einem Gemisch von Essigsäure/Ameisensäure/Wasser (7:1:2) abgespalten. Der Methylester oder p-Nitrobenzylester wird unter Verwendung von Hydrazinhydrat in das Hydrazid umgewandelt. Die Methylestergruppe kann mit verdünnter Natriumhydroxidlösung entfernt werden und der t-Butylester wird mit Trifluoressigsäure gespalten.

Ein Peptid mit endständigem C bestehend aus der Aminosäuresequenz von 7–10 bis 31, welches mit dem oben beschriebenen N-endständigen Peptid kondensiert wird, wird vorzugsweise synthetisiert durch Verbindung von C-endständiger Aminosäure (Aminosäure Nr. 31) oder C-endständigem Fragment, wie ein Peptid aus der Aminosäuresequenz 30–31, 28–31, 25–31, 24–31 oder 23–31, mit jeder Aminosäure oder niederem Peptid bestehend aus 2 bis 4 Aminosäuren in der Reihenfolge der gewünschten Aminosäuresequenz. Beispielsweise kann das C-endständige Fragment 10–31 hergestellt werden durch Kondensation von Aminosäuren von niederen Peptiden, wie das Dipeptid 30–31 oder 28–29, das Tripeptid 25–27, das Dipeptid 23–24, das Tripeptid 21–23, das Tetrapeptid 16–19 und das Hexapeptid 10–15 in der Reihenfolge der Aminosäuresequenz vom C-Ende her. Bevorzugte Schutzgruppen für jede Gruppe sind: α -Aminogruppe durch t-Butoxycarbonylgruppe; Seitenkettencarboxylgruppe von Glutaminsäure durch Benzylestergruppe; ϵ -Aminogruppe von Lysin durch o-Chlorbenzyloxycarbonylgruppe; Hydroxylgruppe von Serin und Threonin durch Benzylgruppe; Hydroxygruppe von Tyrosin durch Dichlorbenzylgruppe und Iminogruppe von Histidin durch Tosylgruppe.

Die Schutzgruppe des C-endständigen Fragmentes 7–10 bis 31 mit geschützten α -Aminogruppen, z. B. das Docosa-peptidamid der 10–31 Sequenz, wird mit einer geeigneten Methode entfernt. Zum Beispiel wird die Tritylgruppe durch wässrige Essigsäure abgespalten. Diphenylisopropoxycarbonyl-, Benzyloxycarbonyl- und t-Butoxycarbonylgruppen werden durch ein Gemisch von Eisessig, Ameisensäure und Wasser beziehungsweise durch Hydrierung und mit Trifluoressigsäure entfernt.

Auf diese Weise wird das Hentriacontapeptidamid mit geschützter α -Aminogruppe, geschützter ϵ -Aminogruppe, gegebenenfalls geschützter Seitenkettencarboxylgruppe und/oder Hydroxylgruppe erhalten. Diese Schutzgruppen werden wie oben beschrieben, abgespalten, vorzugsweise durch Säurezersetzung, z. B. mittels Fluorwasserstoff, und schliesslich kann das Produkt der Formel I erhalten werden.

Bei der Synthese des neuen, Polypeptides nach der Merrifield-Festphasenpeptidsynthesen-Methode kann die Hydroxygruppe in Serin und Threonin z. B. durch die Benzylgruppe geschützt werden und die Hydroxygruppe in Tyrosin wird mit der Dichlorbenzylgruppe geschützt; die Iminogruppe in Histidin kann z. B. durch 1-Benzyloxycarbonylamino-2,2,2-trifluoräthylgruppe und die die Seitenkette in Glutaminsäure z. B. mit einer Benzylestergruppe geschützt werden. Die Schutzgruppe für die α -Aminogruppe ist z. B. eine t-Butyloxycarbonyl-, o-Chlorbenzyloxycarbonyl- oder o-Brombenzyloxycarbonylgruppe.

Das geschützte Peptid wird vom Trägerharz entfernt und die Schutzgruppe wird durch wasserfreien Fluorwasserstoff entfernt.

Eine einstufige Entfernung aller Schutzgruppen durch Hydrolyse unter Verwendung von Trifluoressigsäure kann durchgeführt werden, wenn die t-Butoxycarbonylgruppe zum Schutz der Aminogruppe verwendet wird, der t-Butylester für die Seitenkettencarboxylgruppe, der t-Butyläther für die Hydroxylgruppe in Serin, Threonin und Tyrosin und die 2,2,2-Trifluor-1-t-butoxycarbonylaminoäthylgruppe für den Schutz der Iminogruppe in Histidin.

Das neue Polypeptid der Formel I kann in Form einer freien Base oder eines Salzes erhalten werden. Die freie Base kann auf übliche Weise aus den Salzen erhalten werden. Die freie Base kann in ihre pharmakologisch annehmbaren Salze übergeführt werden durch Umsetzung mit einer organischen Säure, wie Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure, oder mit einer organischen Säure, wie Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Glycolsäure, Milchsäure, Brenztraubensäure, Oxalsäure, Bernsteinsäure, Apfelsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Benzoesäure, Salicylsäure, Nieralkansulfonsäure, Benzolsulfonsäure oder Toluolsulfonsäure.

Das neue Polypeptid kann in einen Komplex übergeführt werden durch Zusatz von verschiedenen anorganischen oder organischen Substanzen. Ein solcher Komplex wird erhalten durch Zusatz einer Art anorganischer oder organischer Substanzen zu einem langkettigen Polypeptid, und der Komplex weist eine Langzeitwirkung auf, wenn er verabreicht wird. Beispiele derartiger komplexbildender Substanzen sind anorganische Verbindungen, abgeleitet von Metallen wie Calcium, Magnesium oder Zink, insbesondere das Phosphat, Pyrophosphat oder Polyphosphat dieser Metalle. Weitere Beispiele derartiger komplexbildender organischer Substanzen sind nicht-antigene Gelatine, Carboxymethylcellulose, Sulfonsäureester oder Phosphorsäureester von Alginsäure, Dextran, Polyalkohol, Glutaminsäure, Protamin oder dergleichen.

Die Abkürzungen in der vorliegenden Beschreibung weisen die folgende Bedeutung auf:

BOC:	t-Butoxycarbonyl
Cbz:	Benzyloxycarbonyl
Bzl:	Benzyl
Bzl (Cl ₂):	Dichlorbenzyl
OEt:	Äthylester
OBzl:	Benzylester
OSU:	N-Hydroxysuccinylimidester
Ser:	L-Serin
Leu:	L-Leucin
Val:	L-Valin
Arg:	L-Argin
Ala:	L-Alanin
Lys:	L-Lysin
Glu:	L-Glutaminsäure
Tyr:	L-Tyrosin
Phe:	L-Phenylalanin
TFA:	Trifluoressigsäure
CHA:	Cyclohexylamin
THF:	Tetrahydrofuran
AcOEt:	Äthylacetat
WSC:	N-Äthyl-N'-dimethylaminopropyl-carbodiimid
HOSU:	N-Hydroxysuccinylimid
MeOH:	Methanol
AcOH:	Essigsäure
HMPA:	Hexamethyl-phosphorsäure-triamid
AOC:	t-Amyloxycarbonyl
CICbz:	o-Chlorbenzyloxycarbonyl
Tos:	Tosyl
OBu:	t-Butylester
ONP:	p-Nitrophenylester
Asn:	L-Asparagin

Thr:	L-Threonin
Pro:	L-Prolin
Asp:	L-Aspartinsäure
Gly:	Glycin
Gln:	L-Glutamin
His:	L-Histidin
Met:	L-Methionin
Ile:	L-Isoleucin
TosOH:	p-Toluolsulfonsäure
DCHA:	Dicyclohexylamin
DMF:	Dimethylformamid
DCC:	Dicyclohexylcarbodiimid
HOBT:	1-Hydroxybenzotriazol
EtOH:	Äthanol
BuOH:	Butanol

Die Bestimmungsmethode für die Serumcalcium reduzierende Wirksamkeit, der Träger und das Entwicklersystem für die Dünnschichtchromatographie sowie die Bedingungen für die Aminosäureanalyse sind die folgenden:

Bestimmungsmethode:

Die Probe wird mit 0,1N Natriumacetat – 0,1 % Eiweisslösung verdünnt. Männliche Ratten werden einzeln mit 0,2 ml der jeweiligen verdünnten Lösung intravenös injiziert. Nach 1 h werden alle Ratten getötet, um ihr Blut zu erhalten, und die Serumcalciumwerte von jeder Blutprobe wird durch Atomabsorptionsspektrophotometrie bestimmt. Andererseits wird ein Standard-Salm-Calcitonin, welches vom National Institute for Biological Standard and Control vertrieben wird, als Standardkurve verwendet. Durch Vergleich mit der Wirksamkeit des entsprechenden Research Standard's wird die Wirksamkeit des Calcitonins in der Probe bestimmt.

Aminosäureanalyse:

Eine Probe wird mit 6N HCl unter Zusatz einiger Tropfen Anisol bei 110° C während 45 h hydrolysiert, dann unter vermindertem Druck getrocknet und schliesslich der Aminosäureanalyse unterworfen.

Beispiel:

Herstellung von

$$\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-CO-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-NHCHCO-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH}_2$$
 2,0 g (0,6 m Mol)
 BOC-Thr(Bzl)-Tyr[Bzl(Cl₂)]-Thr(Bzl)-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Asn-Lys(ClCbz)-Phe-His-Thr(Bzl)-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Asn-Lys(ClCbz)-Phe-His-Thr(Bzl)-Phe-Pro-Gln-Thr(Bzl)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂

wurden in 10 ml TFA bei –5° C gelöst. Nach 30 min Rühren bei Zimmertemperatur wurde die Lösung im Vakuum konzentriert und mit Äthyläther versetzt, um einen Niederschlag zu bilden. Der Niederschlag wurde über Natriumhydroxid getrocknet. Der trockene Niederschlag wurde in 10 ml DMF gelöst und mit Triäthylamin unter Kühlung auf pH 9 gebracht. Zu dieser Lösung wurde Wasser zugesetzt, um einen Niederschlag zu erzeugen. Der Niederschlag wurde über P₂O₅ getrocknet, um die BOC-Verbindung in Form ihrer freien Base zu erhalten.

0,8 g (0,71 m Mol)

$$\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-CO-Gly-Asn-Leu-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-HNCHCO-Met-Leu-Gly-OH}$$

wurden in 5 ml DMF:N-Methylpyrrolidon (1:1) gelöst. HOSU (122 mg) wurden zugesetzt und ferner DCC (146 mg) gelöst in DMF (3 ml) unter Kühlen zugesetzt, und anschliessend über Nacht gerührt. Nach der Umsetzung wurde der Niederschlag entfernt und zu der derart erhaltenen Lösung wurde die oben erhaltene freie de-BOC-Base zugesetzt und HOBT (100 mg) zugegeben und während 5 Tagen bei 30° C gerührt. Nach der Reaktion wurde Wasser zugesetzt. Der derart erhaltene Niederschlag wurde durch Filtrieren gesammelt, mit Wasser gewaschen und getrocknet, um 2,6 g

$$\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-CO-Gly-Asn-Leu-Ser(Bzl)-Thr(Bzl)-HNCHCO-Met-Leu-Gly-Thr(Bzl)-Tyr(Bzl(Cl}_2\text{))-Thr(Bzl)-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Asn-Lys(ClCbz)-Phe-His-Thr(Bzl)-Phe-Prp-Gln-Thr(Bzl)-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH}_2$$

als rohes Produkt zu erhalten.

1,0 g des derart erhaltenen rohen Materials wurde mit Fluorwasserstoff (25 ml), Methionin (0,1 g) und Anisol (2 ml) bei –5° C während 60 min unter Kühlung mit Trockeneis-Methanol und unter vermindertem Druck in Gegenwart von Dimethylthioäther umgesetzt. Nach dem Abdestillieren des Fluorwasserstoffes wurde der Rückstand mit Diäthyläther gewaschen und der gebildete Niederschlag durch Dekantieren gewonnen, dieses Dekantieren dreimal wiederholt und der Niederschlag schliesslich in einer Lösung von Essigsäure (30 ml) und Wasser (10 ml) gelöst. Die Lösung wurde über eine Säule aus «Dowex» 1×2 (Acetatform) (2,5×8 cm) geleitet, mit Wasser 6200 ml gewaschen und das Eluat wiederum über eine Säule aus HP-20 (2,5×7 cm) geleitet. Eine 80%ige Äthanollösung wurde sodann durch die Säulen geleitet und nach dem Abdestillieren des Eluates zwecks Entfernung des Äthanol wurde die Lösung lyophilisiert, wobei 440 mg des Pulvers erhalten wurden. 440 mg dieses Pulvers, gelöst in 0,01 M wässrigem Ammoniumacetat wurden in eine mit CM-Cellulose gepackte Säule (2,2×25 cm) eingeführt und mit je 750 ml einer 0,01 bis 0,2 Mol Ammoniumacetatlösung (pH 4,5) in linear steigender Konzentration eluiert. Fraktionen von je 10 g wurden gesammelt und die aktiven Fraktionen (Fraktionen Nr. 67–70) wurden vereint und gefriergetrocknet, um das aktive Pulver zu erhalten. Das Lyophilisat wurde in 1 M Essigsäure gelöst und über eine Säule von «Sephadex» LH-20 (2,2×137 cm) chromatographiert und mit 1 M AcOH eluiert. Das Eluat (6 g) wurde fraktioniert und die aktiven Fraktionen (Nr. 28–37) gesammelt und lyophilisiert.

Das Lyophilisat wurde in der oberen Schicht eines Gemisches von Butanol:Essigsäure:Wasser (4:1:5) gelöst und die Lösung über eine Säule von «Sephadex» G-25 (2,7×52 cm) geleitet, welche mit der unteren Schicht des oben genannten Lösungsmittelgemisches gepackt war und anschliessend durch die obere Schicht des genannten Lösungsmittelgemisches ersetzt wurde. Die Eluierung erfolgte mit demselben Oberschichtlösungsmittel, um Fraktionen von je 6 g zu erhalten und die aktiven Fraktionen (Nr. 5–14) wurden gesammelt und lyophilisiert. Das derart erhaltene Pulver wurde wiederum unter denselben Bedingungen über «Sephadex» G-25 chromatographiert und lyophilisiert. Das lyophilisierte aktive Pulver wurde in 1 Mol Essigsäure gelöst, über eine Säule aus «Sephadex» LH-20 (2,2×137 cm) geleitet und mit 1 Mol Essigsäure für 5 g der Fraktionen eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereint und lyophilisiert und ergaben 29,7 mg des Produktes (1000 MRC u/mg).

Rf = 0,82 [Träger: Merck-Cellulose, Entwickler: n-Butanol:Essigsäure:Wasser:Pyridin (15:3:12:10)].

R_f = 0,43 [Träger: Merck-Cellulose, Entwickler: n-Butanol:Essigsäure:Wasser (obere Schicht) (4:1:5)].

$[\alpha]_D^{20} = -69,6$ (c = 0,72, 1 M Essigsäure).

Aminosäure-Analyse:

Lys 1,15(1), His 1,01(1), Asp 2,94(3), Thr 4,80(5), Ser 1,05(1),
Glu 2,14(2), Pro 1,96(2), Gly 4,00(4), Ala 2,00(2), Val 9,95(1),
Met 0,87(1), Ile 0,96(1), Leu 1,84(2), Tyr 0,96(1), Phe 3,18(3),
 α -Aminokorksäure 1,02(1).

5