

179. Synthese von Salm-Calcitonin, einem hochaktiven hypocalcämischen Hormon

Vorläufige Mitteilung¹⁾

von **St. Guttman, J. Pless, R. L. Huguenin, Ed. Sandrin, H. Bossert**
 und **K. Zehnder**

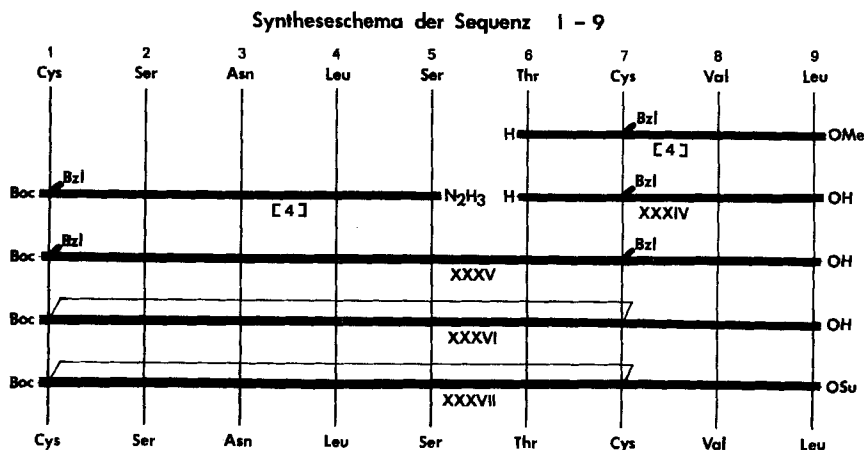
Pharmazeutisch-chemische Forschung, SANDOZ AG., Basel

(28. VI. 69)

Summary. A total synthesis of salmon calcitonin is described. The C-terminal nonapeptide amide 24-32 was coupled with the heptapeptide 17-23. The resulting hexadecapeptide amide 17-32 was reacted with the heptapeptide 10-16 to give the tricosapeptide 10-32. This was condensed with the N-terminal nonapeptide 1-9, yielding the protected dotriacontapeptide amide 1-32. After removal of the protective groups and purification by gel-filtration the free peptide obtained exhibited the physical, chemical and biological properties of the natural hormone. Its hypocalcaemic activity (ca. 3500 MRC U/mg) is 20-30 times higher than that of porcine or human calcitonin.

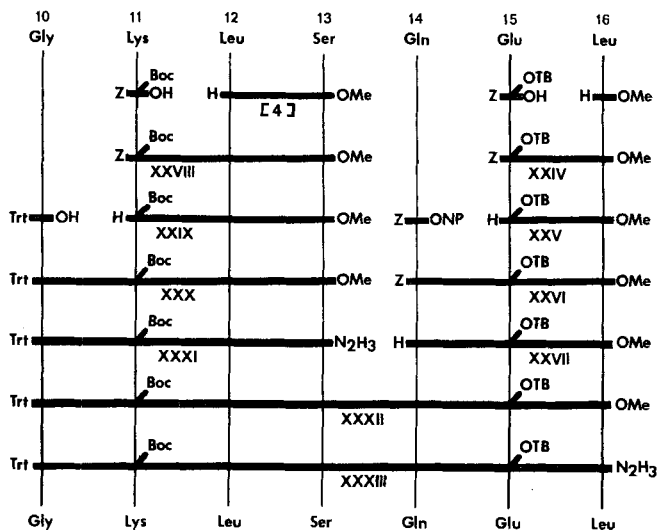
Nach der Strukturaufklärung des Schweinecalcitonins [1], [2] und des menschlichen Calcitonins [3] wurde die Richtigkeit deren Strukturen durch Totalsynthese [4] [5] bewiesen. Im folgenden wird über die Totalsynthese eines dritten Calcitonins, desjenigen vom Salm berichtet.

Anfangs 1969 haben *Corr et al.* [6] aus den ultimobranchialen Drüsen des Salms ein Peptidmaterial extrahiert, das eine unerwartet hohe hypocalcämische Wirksamkeit bei der Ratte aufwies. Nach weitgehender Reinigung erwies sich das Peptid als 20 bis 30 mal aktiver als die bisher bekannten Calcitonine.

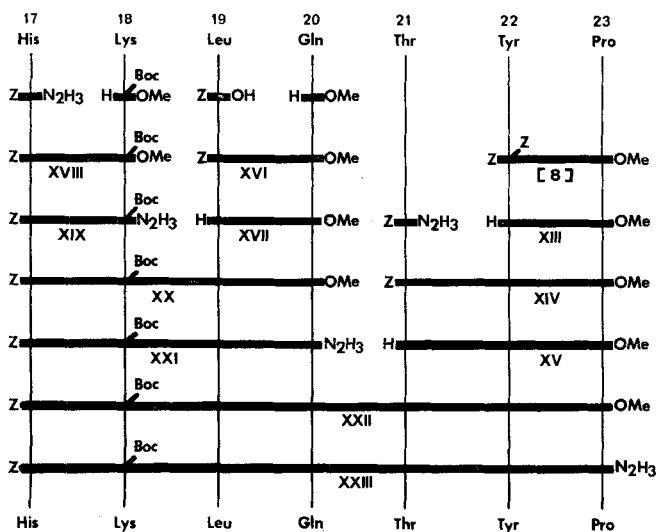


¹⁾ Eine ausführliche Mitteilung soll in Helv. erscheinen.

Syntheschema der Sequenz 10–16



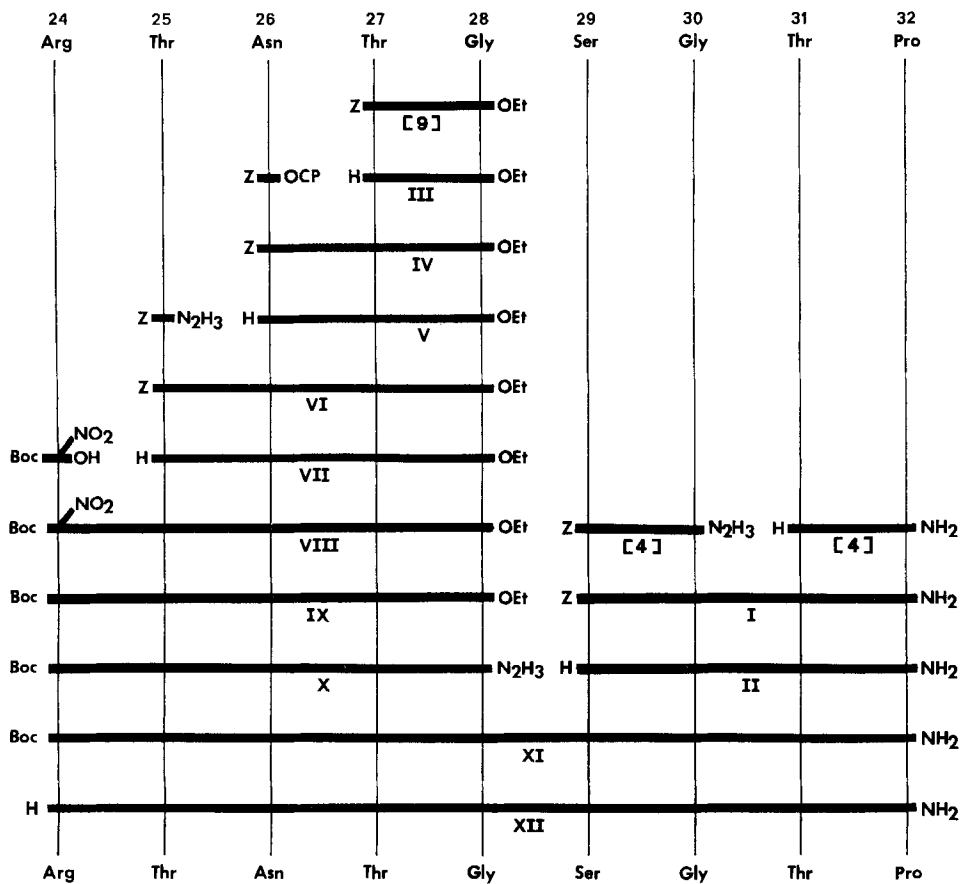
Syntheschema der Sequenz 17–23



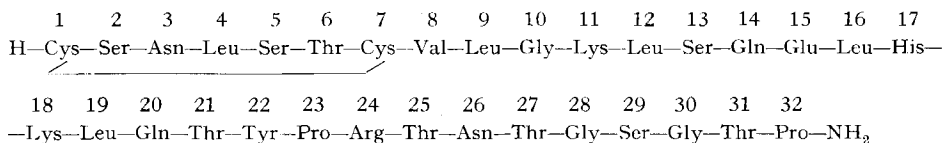
In Zusammenarbeit mit COPP konnten POTTS *et al.* die hohe Wirksamkeit des gereinigten Peptides bestätigen und kurz darauf gelang es ihnen seine Struktur aufzuklären [7]²⁾. Demnach handelt es sich wiederum um ein lineares Dotriacontapeptid, das N-terminal eine mit einer Disulfidbrücke geschlossene Heptapeptid-Schleife ent-

²⁾ Wir danken den Herren Dres. H. D. NIALL, H. T. KEUTMANN, D. H. COPP und J. T. POTTS für die Überlassung der Ergebnisse der von ihnen durchgeführten Strukturaufklärung.

Syntheschema der Sequenz 24–32



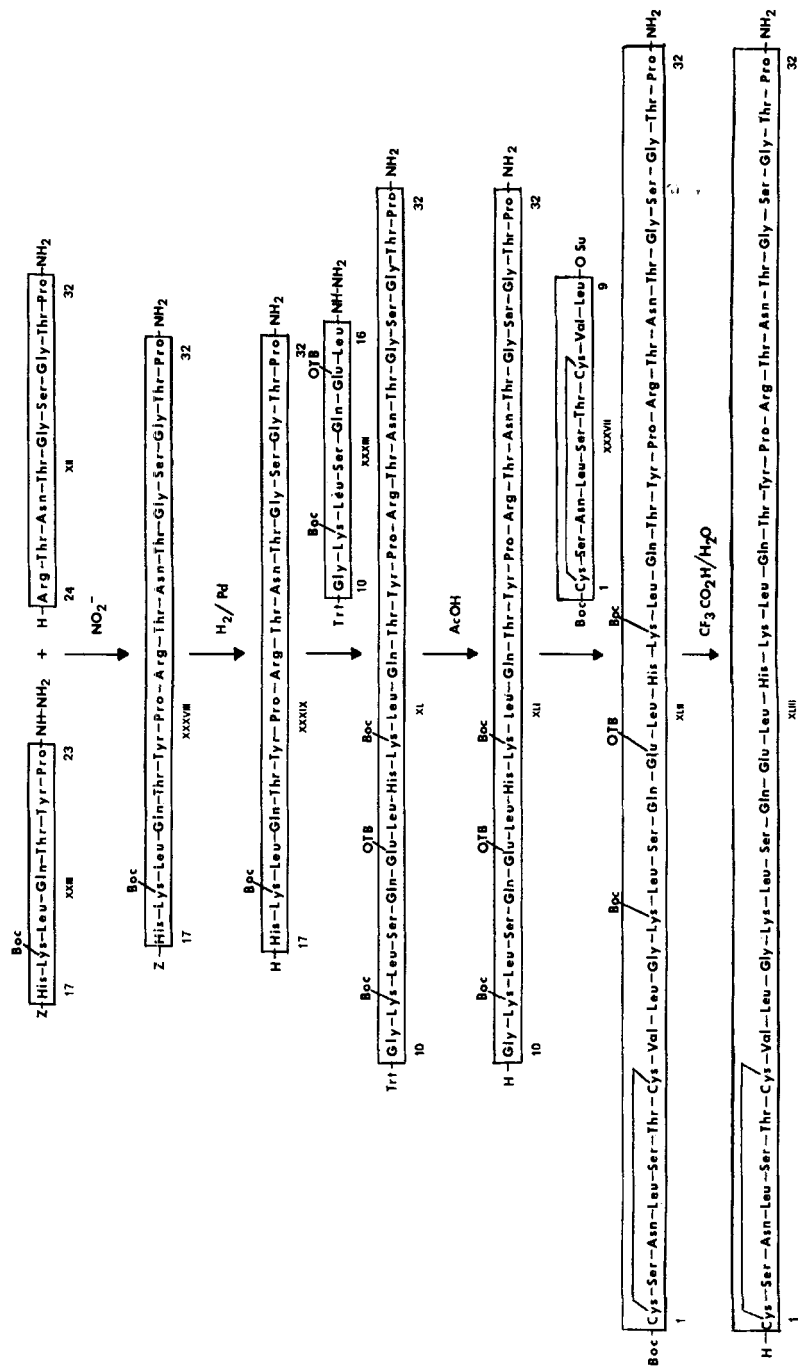
hält, und C-terminal einen Prolinamid-Rest trägt. Die primäre Struktur des Salm-Calcytonins ist die folgende³⁾):



Beim Aufbau der Peptidkette haben wir uns von Prinzipien führen lassen, die wir bei der Synthese des Schweine-Calcitonins angewandt hatten [4]. Der Weg der Synthese ist aus den folgenden Schemata ersichtlich:

Zunächst haben wir die vier grösseren Sequenzen 1–9 (XXXVII), 10–16 (XXXIII), 17–23 (XXIII) und 24–32 (XII) aufgebaut.

³⁾ Abgekürzte Schreibweise entsprechend den Empfehlungen der «IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature» [11].



Anschliessend haben wir das Heptapeptid XXIII mit dem Nonapeptid XII nach der Azidmethode gekuppelt. Nach der Reinigung des erhaltenen Hexadecapeptids XXXVIII durch Säulenchromatographie auf Kieselgel wurde die Z-Gruppe hydrolytisch gespalten und das so erhaltene Hexadecapeptid XXXIX mit dem Heptapeptid XXXIII wiederum nach der Azidmethode zum Tricosapeptid XL kondensiert. Nach chromatographischer Reinigung auf Kieselgel wurde die Trityl-Gruppe durch Behandlung mit Essigsäure selektiv gespalten und das erhaltene Tricosapeptid XLI mit dem Nonapeptid XXXVII zu dem Dotriacontapeptid XLII kondensiert.

Anschliessend wurden sämtliche Schutzgruppen durch Behandlung mit wasserhaltiger Trifluoressigsäure abgespalten und das freie Peptid durch Gelfiltration auf Biogel P6 in 0,2N Essigsäure gereinigt. Das erhaltene Dotriacontapeptid XLIII erwies sich bei Dünnschichtchromatographie (2 Systeme), Hochspannungselektrophorese (bei 2 pH), Diskelektrophorese⁴⁾, Gegenstromverteilung und Gelfiltration als einheitlich. Die Aminosäureanalyse ergab die 32 Aminosäuren in den erwarteten Verhältnissen.

Charakterisierung der Produkte⁵⁾

Nr.	Substanz	Smp.	$[\alpha]_D^{20}$ und Lösungsmittel
I	Z-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂	132° zers.	– 21,8° DMF
II	H-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂	95° zers.	– 26,8° DMF
IV	Z-Asn-Thr-Gly-OEt	225°	– 4,3° DMF
V	H-Asn-Thr-Gly-OEt	160°	– 8,6° DMF
VI	Z-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt	230°	– 7,8° DMF
VII	H-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt	181°	– 17,4° DMF
VIII	Boc-Arg(NO ₂)-Thr-Asn-Thr-Gly-OEt	amorph	– 3,6° DMF
X	Boc-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-NH-NH ₂	175° zers.	– 41,9° AcOH 1N
XI	Boc-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂ · AcOH	182° zers.	– 39,4° AcOH 1N
XII	H-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂ · 2 AcOH	195° zers.	– 51,1° AcOH 1N
XIII	H-Tyr-Pro-OMe · HCl	amorph	+ 64,2° MeOH
XIV	Z-Thr-Tyr-Pro-OMe	80° zers.	– 22,7° DMF
XV	H-Thr-Tyr-Pro-OMe	136° zers.	– 38,0° DMF

⁴⁾ Wir danken Herrn Dr. ROSENTHALER für die Ausführung der Diskelektrophoresen.

⁵⁾ Die optischen Drehungen wurden auf dem Polarimeter PERKIN ELMER, Typ 114 in Konzentration von 0,5–1,0 gemessen.

Die Symbole $E_{1,9}$ bzw. $E_{5,8}$ bedeuten den Migrationsabstand der Substanz in der Hochspannungselektrophorese bei pH 1,9 bzw. 5,8. Beim E mit einem Exponenten bedeutet E^0 , dass die Substanz ohne Vorbehandlung aufgetragen wurde; E^{AcOH} bedeutet eine vorherige Behandlung mit Essigsäure. 0,3 His oder 0,9 Trp heisst, dass die Substanz 0,3mal soweit wie das Histidin oder 0,9mal soweit wie das Tryptophan bei dem gegebenen pH in der Hochspannungselektrophorese wandert. R_{fDK} bedeutet die Wandergeschwindigkeit in der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten.

Für die Aminosäureanalysen wurden die Substanzen in HCl 6N während 24 Std. bei 115° unter Vakuum hydrolysiert. Die Aminosäurebestimmungen wurden auf dem Unicrom Amino Acid Analyser (BECKMAN, München) durchgeführt. Die Werte für die teilweise während der Hydrolyse zerstörten Aminosäuren (Cys, Ser, Thr, Tyr) sind nicht korrigiert.

Nr.	Substanz	Smp.	$[\alpha]_D^{20}$ und Lösungsmittel
XVI	Z-Leu-Gln-OMe	179°	– 16,5° DMF
XVII	H-Leu-Gln-OMe · HBr	130° zers.	+ 9,3° DMF
XVIII	Z-His-Lys(Boc)-OMe	121°	– 9,5° DMF
XIX	Z-His-Lys(Boc)-NH-NH ₂	138°	– 9,2° DMF
XX	Z-His-Lys(Boc)-Leu-Gln-OMe	120° zers.	– 19,3° DMF
XXI	Z-His-Lys(Boc)-Leu-Gln-NH-NH ₂	199°	– 5,0° DMF
XXII	Z-His-Lys(Boc)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-OMe	215° zers.	– 23,0° DMF
XXIII	Z-His-Lys(Boc)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-NH-NH ₂	145°	– 22,0° DMF
XXIV	Z-Glu(OTB)-Leu-OMe	31°	– 12,1° DMF
XXVI	Z-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe	220°	– 39,6° DMF
XXVII	H-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe	123°	– 13,7° DMF
XXVIII	Z-Lys(Boc)-Leu-Ser-OMe	110°	– 13,8° DMF
XXIX	H-Lys(Boc)-Leu-Ser-OMe	70° zers.	– 13,3° DMF
XXX	Trt-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser-OMe	100° zers.	– 8,2° DMF
XXXI	Trt-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser-NH-NH ₂	204°	– 6,1° DMF
XXXII	Trt-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-OMe	235°	– 20,4° DMF/H ₂ O (8:2)
XXXIII	Trt-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-NH-NH ₂	265°	– 18,2° DMF/H ₂ O (8:2)
XXXIV	H-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH	219°	– 53,1° NH ₄ ON 1N
XXXV	Boc-Cys(Bzl)-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys(Bzl)-Val-Leu-OH	217°	– 38,3° Pyridin
XXXVI	Boc-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OH	238°	– 18,6° DMF/H ₂ O (7:3)
XXXVII	Boc-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-OSu	246°	– 32,0° DMF/H ₂ O (7:3)
XXXVIII	Z-His-Lys(Boc)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂ · HCl:		Smp. 185–190° (zers.); $[\alpha]_D^{20} = -49,9^\circ$ [DMF/H ₂ O (7:3)]; $E_{1,9}^\circ = 0,7$ Trp; $E_{5,8}^\circ = 0,4$ His; $Rf_{DK} = 0,3$ [CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O (70:30:5)]; Aminosäureanalyse: Arg _{0,99} , Asp _{1,04} , Glu _{1,05} , Gly _{1,96} , His _{1,02} , Leu _{1,02} , Lys _{0,98} , Pro _{1,77} , Ser _{0,89} , Thr _{3,84} , Tyr _{1,01}
XXXIX	H-His-Lys(Boc)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂ · HCl:		Smp. 210° (zers.); $[\alpha]_D^{20} = -44,9^\circ$ (AcOH 95%); $E_{1,9}^\circ = 0,9$ Trp; $E_{5,8}^\circ = 0,5$ His; $Rf_{DK} = 0,1$ [CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O (70:30:5)]
XL	Trt-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(Boc)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂ · 2 AcOH:		Smp. 195° (zers.); $[\alpha]_D^{20} = -26,5^\circ$ [DMF/H ₂ O (7:3)]; $E_{1,9}^{AcOH} = 0,7$ Trp; $E_{5,8}^{AcOH} = 0,6$ His; $Rf_{DK} = 0,4$ [CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O (70:30:5)]; $Rf_{DK} = 0,8$ [CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O (10:10:1)]; Aminosäureanalyse: Arg _{0,99} , Asp _{1,04} , Glu _{3,11} , Gly _{3,04} , His _{0,91} , Leu _{3,06} , Lys _{1,83} , Pro _{2,03} , Ser _{1,85} , Thr _{3,93} , Tyr _{1,05}
XLI	H-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-Leu-His-Lys(Boc)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH ₂ · 3 AcOH:		Smp. 240° (zers.); $[\alpha]_D^{20} = -29,5^\circ$ [AcOH/H ₂ O (95:5)]; $E_{1,9}^\circ = 0,7$ Trp; $E_{5,8}^\circ = 0,6$ His; $Rf_{DK} = 0,3$ [CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O (70:30:5)]

- XLII Boc-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys(Boc)-Leu-Ser-Gln-Glu(OTB)-
 Leu-His-Lys(Boc)-Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-
 NH₂ · 2 AcOH:
 Smp. 230° (zers.); $[\alpha]_D^{20} = -20,1^\circ$ [DMF/H₂O (7:3)]; Rf_{DK} = 0,9 [CHCl₃/CH₃OH/
 H₂O (10:10:1)]; Rf_{DK} = 0,8 [CH₃OH/AcOH/H₂O (7:2:2)]
- XLIII H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-
 Leu-Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro-NH₂:
 Smp. 220° (zers.); $[\alpha]_D^{20} = -55,0^\circ$ [AcOH/H₂O (1:1)]; $E_{1,9}^0 = 0,9$ Trp; $E_{5,8}^0 = 0,6$
 His; Rf_{DK} = 0,7 [*n*-BuOH/Py/AcOH/H₂O (8:5:3:6)]; $K = 0,59$ [*s*-BuOH/H₂O/
 CF₃CO₂H (120:160:1)] Arg_{1,05}, Asp_{1,90}, Cys_{2,1,62}, Glu_{3,08}, Gly_{3,11}, His_{0,96}, Leu_{4,82},
 Lys_{2,07}, Pro_{2,10}, Ser_{3,25}, Thr_{4,52}, Tyr_{0,78}

Die biologische Prüfung ergab eine Wirksamkeit von ca. 3500 MRC Einheiten/mg [10], d. h. etwa 20mal höher als diejenige des Schweine-Calcitonins [1] [2] [4] und 35-mal stärker als diejenige des menschlichen Calcitonins [3] [5].

Was die Wirkungskdauer anbetrifft, so zeigte das synthetische Material ähnlich dem natürlichen Salm-Calcitonin bei der Ratte mit einer Dosis von 10 MRC E./kg eine über 16 Std. anhaltende hypocalcämische Wirkung, d. h. etwa 5mal länger als das Schweine-Calcitonin.

Auf Grund der Übereinstimmung der oben beschriebenen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften des synthetischen Dotriacontapeptids XLIII mit denjenigen, welche von COPP *et al.* [6] und NIALL *et al.* [7] für das natürliche Salm-Calcitonin angegeben wurden, kann geschlossen werden, dass das von uns synthetisierte Peptid mit der Struktur des natürlichen Hormons übereinstimmt.

Wir danken Herrn Dr. R. A. BOISSONNAS für seine wertvollen Anregungen bei der Ausführung dieser Arbeit.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] P. H. BELL, W. F. BARG, D. F. COLUCCI, N. C. DAVIES, C. DZIOBKOWSKI, M. E. ENGLERT, E. HEYDER, R. & E. H. SNEDEKER, J. Amer. chem. Soc. **90**, 2704 (1968); R. NEHER, B. RINIKER, H. ZUBER, W. RITTEL & F. W. KAHNT, Helv. **51**, 917 (1968).
- [2] J. T. POTTS, H. D. NIALL, H. T. KEUTMANN, H. B. BREWER & L. J. DEFTOS, Proc. nat. Acad. Sci. **59**, 1321 (1968).
- [3] R. NEHER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, Helv. **51**, 1900 (1968).
- [4] W. RITTEL, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER & P. SIEBER, Helv. **51**, 924 (1968); ST. GUTTMANN, J. PLESS, ED. SANDRIN, P.-A. JAQUENOUD, H. BOSSERT & H. WILLEMS, Helv. **51**, 1155 (1968).
- [5] P. SIEBER, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINIKER & W. RITTEL, Helv. **51**, 2057 (1968).
- [6] C. O. PARKES, R. K. O'DOR & D. H. COPP, Feder. Proc. **28/2**, 413 (1969).
- [7] H. D. NIALL, H. T. KEUTMANN, D. H. COPP & J. T. POTTS, im Druck in Proc. nat. Acad. Sci. 1969.
- [8] H. J. PANNEMAN, A. F. MARX & J. F. ARENS, Rec. Trav. chim. Pays Bas **78**, 487 (1959).
- [9] K. PODUSKA & M. I. TITOV, Coll. czech. chem. Commun. **30**, 1611 (1965).
- [10] M. A. KUMAR, E. SLACK, A. EDWARDS, H. A. SOLIMAN, A. BAGHDIAZT, G. V. FOSTER & I. MACINTYRE, J. Endocrin. **33**, 469 (1965).
- [11] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, Tentative Rules, abbreviated Designation of Amino Acid Derivatives and Polypeptides, Biochem. biophys. Acta **121**, 1 (1966).