

**DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO**

N.º 97 295

**REQUERENTE: CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA. japonesa,
com sede em Nº 5-1, 5-chome, Ukimai, Kita-
-ku, Tokyo, Japão**

**EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA CALCITONINA
HIBRIDA"**

INVENTORES: Eigoro Murayama e Tohru Hoshi

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

Japão, 9 de Abril de 1990 e 1 de Setembro de 1990, sob os
nºs. 93656/1990 e 231913/1990, respectivamente.

Descrição da patente de invenção de CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, japonesa, industrial e comercial, com sede em Nº 5-1, 5-chome, Ushima, Kita-ku, Tokyo, Japão, (inventores: Eigore Murayama e Thhru Hoshi, residentes no Japão), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA CALCITONINA HIBRIDADA"

Descrição

ENQUADRAMENTO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se a um processo para a preparação de novos análogos da calcitonina possuindo actividade biológica.

Sabe-se que a calcitonina ocorre naturalmente na enguia, salmão, galinha, perce, hemem, bei, ovelha e rato. Seja qual for a sua origem, a calcitonina de ocorrência natural é constituida por 32 aminoácidos. Por exemplo, a calcitonina humana tem a seguinte estrutura de peptídos:

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Ala-Pro-NH₂
31 32

A calcinonina de enguia tem a seguinte estrutura de péptidos:

H-Cys-Ser-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-
1' 2' 3' 4 5 6 7 8 9 10

Lys-Leu-Ser-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Thr-Pro-NH₂
31 32

A calcitonina inherentemente presente em seres humanos e animais é de ora em diante colectivamente referida como "calcitonina nativa".

A Descrição Pública da Patente Japonesa Nºs. 277698/1988, 284198/1988, 287800/1988, J. Biochem. Vol. 159, p. 125 (1986), Endocrinology, Vol. 117, p. 80 (1987) e J. Biochem. Vol. 162, p. 399 (1987) refere análogos da calcitonina nativa. Os análogos da calcitonina nativa incluem: análogos possuindo pelo menos um dos resíduos de aminoácidos na calcitonina nativa substituídos por outro resíduo de aminoácido (de tipo substituição); análogos que possuem pelo menos um dos resíduos de aminoácidos na calcitonina eliminado (de tipo eliminação); análogos que possuem pelo menos um resíduo de aminoácido adicionado entre os resíduos de aminoácido na calcitonina nativa ou no seu terminal (tipo de adição); e análogos que possuem dois ou mais tipos de substituição, eliminação e adição combinados em conjunto. Quando são substituídos, eliminados ou adicionados, dois ou mais resíduos de aminoácidos, eles podem estar adjacentes ou afastados na estrutura de péptidos. Estes tipos de calcitonina nativa são de agora em diante referidos como "análogos de calcitonina".

A calcitonina humana nativa está inherentemente presente nos seres humanos mas as suas actividades biológicas nos seres humanos tem-se revelado baixas. Por outro lado, as calcitoninas nativas derivadas de animais diferentes do homem como por exemplo o salmão, enguia e galinha tem elevado actividade biológica para o homem e parecem ser premissores para a utilização como agentes terapeuticos para a osteoporose, hipercalcemia neoplásica e a doença de Paget. Além disso, os análogos de calcitonina de enguia tem sido comercialmente produzidos como agentes terapeuticos. Contudo, a calcitonina nativa derivada de animais diferentes de seres humanos e os seus análogos provocam efeitos naturais em seres humanos como por exemplo náuseas severas, desordens na função do sistema digestivo e antigenicidade. A calcitonina humana tem poucos, se alguns, efeitos laterais.

As náuseas provocadas pela calcitonina nativa derivada de animais diferentes de seres humanos e seus análogos é descrita nas seguintes referencias:

- 1) K. Takahashi. e col., "Gan to Kagaku Ryoho (Cancer and Chemotherapy)", Vol. 12, Nº 10, 2004-2010 (1985);
- 2) J. Egawa e col., "Gan no Rinsho (Clinical Aspects of Cancer)", Vol. 30, Nº 3, 251-258 (1984); e
- 3) G.F. Mazzuelli e col., Calcif. Tissue Int., 38, 3-8 (1986).

Os problemas nas funções do sistema digestivo provocadas pela calcitonina nativa derivada de animais diferentes do homem e seus análogos são descritas nas seguintes referências:

- 1) K. Jenderke, Gut (England), 30. 430-435 (1989);
- 2) K. Janderke e col., J. Clin. Gastroenterol., 12, 22-28 (1990); and
- 3) J. Hetz e col., Digestion, 20, 180-189 (1980).
A antigenicidade de calcitonina nativa derivada de animais diferentes do homem, s em análogos é descrita na referencia seguinte:
 - 1) F.R. Singer e col., J. Clinical Invest., 51, 2331-2338 (1972);
 - 2) J.G. Haddad e col., J. Clinical Invest., 51, 5133-5141 (1972); e
 - 3) A. Grauer e col., J. Bone and Mineral Res., 5, 387-391 (1990).

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem como objecto proporcionar um processo para a preparação de novos análogos da calcitonina que não são até agora conhecidos. Duma forma breve, a presente invenção proporciona uma calcitonina que tem actividade biológica elevada em seres humanos e que contudo tem poucos efeitos laterais nos seres humanos. A calcitonina da presente invenção é um híbrido de calcitonina humana e calcitonina derivada de animais diferentes do homem, nomeadamente, uma calcitonina híbrida constituída por um segmento de peptidos em calcitonina humana e um segmento de peptidos em calcitonina derivada de animais diferentes do homem.

Os presentes inventores descobriram que a actividade dos efeitos laterais provocados no homem pela calcitonina derivada de animais diferentes do homem está localizada predominantemente no terminal amino, particularmente no segmento de peptido consistindo de 1 - 16 resíduos de aminoácido terminais. Também foi descoberto que embora todos os 16 resíduos de aminoácidos terminais possam ser substituídos, os efeitos laterais desejáveis podiam ser eliminados por substituição de pelo menos 10 desses resíduos de aminoácidos.

Para as actividades biológicas mais importantes a calcitonina derivada do homem e de animais diferentes do homem, a sequência de aminoácidos no terminal de ácido carboxílico é importante como é descrito nas seguintes referências:

- 1) René Maier e col., FEBS Letters, 48, 68 (1974);
- 2) René Maier e col., Clinical Endocrinology, 5, 3275 (1976);
- 3) R.M. Epand e col., Eur, J. Brechom., 159, 125 (1986);
e

- 4) D.M. Findlay e col., Endocrinology, 117, 399
(1987).

Os presentes inventores descobriram que o segmento de péptido acima especificado, nomeadamente, o segmento de péptido no terminal de ácido carboxílico que possui as actividades biológicas mais importância, não tinha pontes activas que provocassem efeitos laterais indesejáveis no homem e desenvolvessem uma calcitonina híbrida com base nesta descoberta. Assim, do ponto de vista de uma redução dos efeitos laterais, o segmento de péptido consistindo de resíduos de aminoácidos nas posições 11^a e posteriores na direcção do terminal do ácido carboxílico pode compreender calcitonina humana ou calcitonina derivada de animais diferentes do homem.

Por outro lado, do ponto de vista das actividades biológicas, é preferível a calcitonina que possui actividades biológicas superiores à calcitonina humana. Assim, o segmento de peptido mais perto do terminal carboxi é preferivelmente um segmento de peptido que é derivado de animais diferentes do homem e que tem propriedades biológicas para o homem do que a calcitonina humana. A este respeito, o segmento de péptido em consideração tem pelo menos 4 resíduos de aminoácidos, e tem preferencialmente pelo menos 10 resíduos de aminoácidos.

Dos pontos de vista acima referidos, a calcitonina hidrida da presente invenção consiste em dois segmentos de peptidos compreendendo um deles desde o 1^o ao 10^o resíduo de aminoácidos do terminal amino, que é um segmento em calcitonina derivada do homem e compreendendo os outros e 29^o a 32^o resíduos de aminoácidos na direcção do terminal carbóxi, isto é, um segmento em calcitonina derivada de animais diferentes do homem, sendo o segmento de peptido intermediário constituido pelos resíduos de aminoácido 11^o a 28^o possuindo a sequência de aminoácidos de qualquer

dos tipos de calcitonina. Se desejado, pode existir uma transição entre a sequências de aminoácidos da calcitonina humana em relação à calcitonina não humana em qualquer posição do segmento de péptido entre os resíduos de aminoácidos 11º e 28º.

Para conseguir uma maior redução nos efeitos laterais, o segmento péptido no terminal amino é preferivelmente constituído pelo 1º ao 13º resíduos de aminoácidos da calcitonina humana. Para conseguir uma maior potenciação das actividades biológicas, o segmento de péptido nas posições 22º e 32º é preferivelmente constituído por um segmento de péptido derivado de animais diferentes do homem. O segmento de péptido desde a posição 14º até à posição 21º no terminal amino pode ter a sequência de aminoácidos de qualquer tipo de calcitonina, e pode ser uma transição da sequência de aminoácidos da calcitonina humana em relação à calcitonina não humana em qualquer posição desse segmento intermediário. No caso mais preferido, a calcitonina híbrida da presente invenção é constituída por um segmento de péptido de calcitonina humana nas posições 1º a 16º no terminal amino e no segmento de péptido em calcitonina não humana nas posições 17º a 32º.

DESCRICAÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é um gráfico que mostra a relação com o tempo da concentração de cálcio no plasma sanguíneo durante o tratamento com vários tipos de calcitonina;

A Figura 2 é um gráfico que mostra a variação com o tempo dos valores limites de estimulação após a administração de vários tipos de calcitonina;

A Figura 3 é um gráfico que mostra as alterações no peso corporal de ratos administrados com vários tipos de calcitonina;

A Figura 4 é um gráfico que mostra a absorção de alimentos nos ratos administrados com vários tipos de calcitonina;

A Figura 5 é um gráfico que mostra a relação entre a concentração de calcitonina de salmão e a ligação de anticorpos; e

As Figuras 6 a 9 são gráficos que mostram a eficiência da ligação de calcitonina de salmão e duas calcitoninas híbridas a soro de calcitonina humana anti-salmão.

DESCRICAÇÃO FORMALIZADA DA INVENÇÃO

O termo "calcitonina humana" aqui utilizado significa calcitonina humana nativa e análogos de calcitonina humana não nativa. De modo semelhante, o termo "calcitonina não humana ou calcitonina derivada de animais diferentes do homem" significa calcitonina nativa derivada de animais diferentes do homem e análogos não nativos dessa calcitonina não humana. Os animais diferentes do homem incluem preferivelmente, mas não se limitar à eles, salmão, enguia e galinha. O número de resíduos de aminoácido substituído, eliminados ou adicionados nos dois tipos de análogos de calcitonina não é limitado a qualquer valor particular mas não é preferivelmente superior a 5. Se um segmento de péptido de interesse não contiver mais do que 5 resíduos de aminoácido, o número de resíduos de aminoácidos substituídos, eliminados ou adicionados é preferivelmente não superior a 1, e se esse segmento de péptido não contiver mais do que 10 resíduos de aminoácidos, o número correspondente de resíduos de aminoácidos substituídos, eliminados ou adicionados é preferivelmente não superior a 3.

No caso do segmento de péptido de calcitonina humana, a sequência dos primeiros 10 resíduos de aminoácido a partir do terminal de amino é preferivelmente

igual ao da calcitonina humana nativa, ou pode ser que o segmento de péptido de um análogo de calcitonina humana tenha a mesma sequência de aminoácidos da calcitonina humana nativa com a excepção de o resíduo de metionina na posição 8 ser substituído por um resíduo de valina. Tal como para o segmento de peptido global da calcitonina humana, um análogo preferido é aquele em que não mais do que dois resíduos de aminoácidos são substituídos, eliminados ou adicionados à calcitonina nativa. O análogo mais preferido é aquele em que o segmento de peptido tomado globalmente difere do tipo nativo apenas na substituição no resíduo de metionina na posição 8.

No caso do segmento de péptido da calcitonina derivada de animais diferentes do homem, ele é preferivelmente igual ao segmento de péptido da calcitonina correspondente, ou pode ser o segmento de peptido do análogo de calcitonina não humana que não tenha mais do que 3 resíduos de aminoácidos, substituídos, eliminados ou adicionados ao tipo nativo. Um análogo mais preferido é aquele em que o segmento de péptido, tomado globalmente, tem uma sequência em que apenas um resíduo de aminoácido é substituído ou eliminado do tipo nativo.

Os animais preferidos diferentes do homem são aqueles em que a calcitonina derivada tem actividades biológicas superiores em relação ao homem. Exemplos desses animais incluem peixes, como por exemplo salmão e enguia, como por exemplo à galinha. O salmão e a galinha são os mais preferidos, sendo o salmão particularmente preferido.

Tendo estes factos em consideração, a calcitonina híbrida da presente invenção tem preferivelmente a seguinte sequência de aminoácidos:

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met (ou Val)-Leu-Gly-
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp (ou Glu)-Phe (ou Leu)-Asn (ou His)-
11 12 13 14 15 16 17
Lys-Phe (ou Leu ou Des)-His (ou Gln)-Thr-Tyr-Pro-Arg-
18 19 20 21 22 23 24
Thr-Asn (ou Asp)-Thr (ou Val)-Gly-Ser (ou Ala)-Gly-Thr-
25 26 27 28 29 30 31 32
Pro-NH₂

Na calcitonina hibrida da presente invenção, a parte da estrutura da calcitonina global derivada de animais diferentes do homem como por exemplo salmão, enguia e galinha que provocam efeitos laterais quando administrados ao homem (por exemplo náuseas, problemas nas funções do sistema digestivo e antigenicidade) é substituído pelo segmento correspondente da calcitonina humana que não provoca esses efeitos laterais, sendo os efeitos laterais provocados pela primeira parte reduzidos ou inteiramente eliminados. Isto é equivalente a dizer que a calcitonina hibrida da presente invenção tem o ponto farmacologicamente activo da calcitonina humana substituído pelo segmento correspondente da calcitonina não humana de modo a potenciar as actividades fisiológicas pretendidas da calcitonina humana.

A calcitonina híbrida da presente invenção pode ser sintetizada por síntese em fase sólida, utilizando resinas de polímero ou por síntese em fase líquida, que é vulgarmente utilizada nas técnicas de síntese orgânica. A utilização da síntese em fase sólida é preferida

no caso da síntese de uma quantidade comparativamente pequena de péptidos. Por outro lado, a utilização da síntese em fase líquida é preferida no caso de uma síntese de uma grande quantidade de peptídos. Nos exemplos que se apresentam a seguir nesta descrição, os péptidos foram sintetizados por síntese de fase sólida. Contudo, se a calcitonina híbrida da presente invenção é ou deve ser sintetizada em grande quantidade, a utilização da síntese em fase líquida, que é uma técnica bem conhecida da síntese dos péptidos, é a preferida.

O procedimento habitual da síntese em fase líquida cemeça com a síntese de pelo menos dois péptidos parciais, sendo cada um deles constituído por dois ou mais resíduos de aminoácidos, em seguida ligam-se estes peptídos parciais sucessivamente e finalmente obtém-se o péptido pretendido que possui a sequência de aminoácidos acima especificada (no caso da presente invenção, o péptido pretendido é a calcitonina híbrida que já foi acima descrita). A síntese em fase líquida é ainda caracterizada por se efectuar a reacção de síntese de péptido em meio líquido, particularmente num meio como por exemplo a dimetilformamida ou o tetrahidrofurano. Um peptído parcial é tipicamente constituído por 2-20 preferivelmente 3-15, resíduos de aminoácidos. Num caso preferido, cerca de 2-10 unidades destes peptídos parciais são sintetizados e em seguida ligados sucessivamente para sintetizar o péptido pretendido.

Na síntese do péptido acima descrito, os derivados reactivos de aminoácidos são tipicamente utilizados como materiais de partida. Se o aminoácido de partida contiver grupos funcionais activos diferentes daqueles que formam ligações de peptídos, esses grupos funcionais activos são preferivelmente protegidos com grupos protectores, que são removidos após o final de síntese de peptídos. O peptído a ser produzido na presente invenção tem

1-7 pontos de dissulfureto que são formadas em qualquer fase pretendida após a síntese de um peptido parcial com uma sequência 1-7. Contudo, esta ligação de dissulfureto tem baixa estabilidade e é preferivelmente formada após o final da síntese de péptido. Estas condições para os procedimentos de protecção e desprotecção e a formação de uma ligação de dissulfureto são também preferivelmente adoptadas na síntese em fase sólida a ser descrita em seguida.

A síntese em fase sólida é um processo de síntese de um peptido que possui a sequência de aminoácidos pretendida por ligação de resíduos de aminoácidos sucessivamente numa resina veículo. Este processo pode ser efectuado automaticamente com um sintetizador automático.

As resinas que podem ser utilizadas na síntese em fase sólida incluem resinas de clorometilo, resinas de oximetilo, resinas de 4-(oximetil)fenilacetamidometilo, resinas de benzidecilamina e resinas de poliacrilamida.

Os aminoácidos utilizados nestas sínteses são aminoácidos todos opticamente L-isómeros e protegidos, tal como requerido. Exemplos de grupos protectores de α -amino incluem um grupo carbobenzoxi (Z), um grupo t-butil oxicarbonilo (Boc), um grupo 9-fluorofenilmetiloxi-carbonilo (Fmco), um grupo formilo (HOC) e um grupo acetilo (Ac). Grupos protectores de α -carboxi exemplares incluem um grupo benzilo (Bzl), um grupo butilo terciário (But), um grupo metilo (Me) e um grupo etilo (Et) e um grupo fenacilo (Pac). Os grupos que podem ser utilizados para proteger os grupos funcionais em cadeias laterais de aminoácidos incluem: um grupo benzilo (Bzl), e um grupo p-toluenossulfônico (Tos), um grupo p-nitrofenol (NO_2), um grupo benzidrilo (Bzh), um grupo acetamidometilo (Acm), um grupo butilo terciário (But), um grupo butiloxi terciário carbonilo (Boc), um

grupo ciclichexilo (CHex) e um grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilbenzenessulfonile (Mtr). Pode ser utilizado um ou mais destes grupos protectores dependendo do produto que se pretende obter.

A reacção de adição sequencial de aminoácidos pode ser efectuada por condensação desidratante utilizando carbodiimidas ou com a ajuda de ésteres activos. As carbodiimidas úteis incluem diciclohexilcarbodiimida e 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, e os ésteres activos úteis incluem um éster de N-hidrossuccinimida (-OSu), um éster de pentofluorefenol (-OPfp) e um éster de dihidrexibenzotriazina (-ODhbt).

Os catalizadores da reacção que podem ser utilizados incluem a dimetilformamida (DMF), tetrahidrofurano (THF), diclorometano, clorofórmio, acetato de etile, dioxano, sulfóxido de dimetile (DMSO), M-metilpiridina, piridina e água.

Podem ser utilizados vários grupos desprotegidos dependendo do tipo de grupos protectores que se pretendem eliminar e do produto que se pretende obter, e os exemplos úteis incluem: fluorato de hidrogénio, ácido trifluoroacético, ácido trifluorometanosulfónico, amoniáce/metanol, brometo de hidrogénio/ácido acético, hidrogénio/paládio em carbono, acetato de mercúrio, ácido acético/pé de zinco, e uma substância alcalina/água-metanol.

Durante ou após a síntese, podem ser utilizadas várias técnicas de purificação, como por exemplo a cromatografia de fase inversa, cromatografia de fase normal, cromatografia de permuta iónica, e cromatografia de filtração em gel, e recristalização. As ligações de disulfureto podem ser formadas por oxidação com ar atmosférico ou com ferricianete de potássio.

Apresentam-se em seguida exemplos com o objectivo de melhor ilustrar a presente invenção, mas que eles não devem ser tomados como limitativos.

Os exemplos 1 a 6 ilustram a síntese de amostras de calcitonina híbrida da presente invenção, e o Exemplo 7 mostra o resultado da análise da composição em aminoácidos para as amostras de calcitonina sintetizada nos Exemplos 1 a 6. Os exemplos 8-10 descrevem as experiências conduzidas para avaliar as actividades principais da calcitonina híbrida da presente invenção. Os exemplos 11 a 14 descrevem as experiências conduzidas para demonstrar a eliminação dos efeitos laterais da calcitonina.

Exemplo 1

Síntese da calcitonina híbrida (1-16) humana/(17-32) salmão:

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Lys-Leu-Gln-									
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-									
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Thr-Pro-NH ₂									
31	32								

A síntese foi efectuada por meio de um processo de síntese em fase sólida utilizando um sintetizador automático.

(I) Introduzindo prolina em resina de benzidilamina (BHA).

Foram suspensas dez gramas de resina BHA ($-\text{NH}_2$; 0,38 mmol/g) e agitadas em 100 ml de DMF. Após remoção do sobrenadante, adicionaram-se mais 100 ml de DMF, seguidas da adição de BocProOH (15 mmol), DCC (20 mmol) e HOBT (20 mmol). A mistura foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. Após filtração com filtro de vidro, a resina resultante foi lavada com cloreto de metíleno.

Posteriormente, foram adicionados 200 ml de uma solução de cloreto de metíleno a 10% v/v de anidrido acético, e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante uma hora para bloquear os grupos amino residuais. Após o fim da reação, a resina foi lavada com cloreto de metíleno e seca em vazio.

Após secagem, foram adicionados 50 ml de uma solução de cloreto de metíleno contendo 50% v/v de ácido trifluoreacético e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante uma hora. Após filtração com um filtro de vidro, a resina resultante foi lavada sucessivamente com cloreto de metíleno, metanol, cloreto de metíleno e trietilamina e seca em vazio.

(2) Reação de adição sequencial de aminoácidos

Introdução de 1 grama da resina obtida em (1) na coluna de um sintetizador automático, e foram adicionados aminoácidos em sequência nas condições seguintes.

- 
- (i) reacção: 30 min a T.A. em solvente de DMF
 - (ii) lavagem: 10 min a T.A. com DMF
 - (iii) remoção de Fmoc: 10 min a T.A. com 20 v/v% de piperidina em solvente de DMF
 - (iv) lavagem: 10 min a T.A. com DMF

Repetindo as fases (i) - (4), foram adicionados 31 aminoácidos após o Prec. Os aminoácidos utilizados são apresentados na Tabela 1 seguinte.

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430 g
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp(0But)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Met-OPfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595

Após a reacção, os grupos protectores e a resina foram removidos do péptido com o auxílio de fluoreto de hidrogénio, e o péptido foi lavado com éter. O precipitado foi dissolvido numa solução aquosa de 50% v/v de ácido acético, e as substâncias insolúveis foram separadas por filtração. O filtrado foi liofilizado para se obterem cerca de 600 mg do péptido bruto.

(3) Purificação e formação de ligações de dissulfureto

Foi dissolvida uma parte (cerca de 50 mg) do peptido bruto em água contendo 0,1% v/v de TFA e a solução foi submetida a cromatografia líquida de alto rendimento numa coluna de ODS.

Utilizando a solução A (acetonitrilo contendo 0.1% v/v de TFA) e a solução B (água contendo 0.1% v/v de TFA) e a coluna foi eluída com o gradiente gradual (A/B em percentagem v/v) aumentando de 20 até 30 a 40%, e as fracções a 30% de eluição foram recolhidas e liofilizadas.

O péptido liofilizado (46 mg) foi dissolvido em 50 ml de ácido acético a 0.05% v/v e o pH da solução foi ajustado a 8,5 com a solução aquosa 3 M de amoniaco. Posteriormente, foram adicionados 1,5 ml de uma solução 0,1 M de $K_3Fe(CN)_6$ e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos para se formarem ligações de dissulfureto. Após se ajustar o pH a 5,0 com ácido acético a 50%, foi adicionada uma resina de permuta iônica (formada Cl^-) e a mistura foi agitada durante 20 minutos, seguida de separação por filtração da resina.

O filtrado foi concentrado e submetido a cromatografia de alto rendimento numa coluna ODS e purificada de novo pelo mesmo procedimento descrito acima. As fracções a 30% de eluição foram recolhidos e liofilizados

para se obterem 28 g do peptido pretendido.

Exemplo 2

Síntese de calcitonina híbrida de
(1-16) humana/(17-32) enguia

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Lys-Leu-Gln-

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Thr-Pro-NH₂

31 32

(I) Reacção de adição sequencial de aminoácidos.

Foi introduzido 1 grama de resina BAHA incorporado préliminarmente preparada na fase (1) do Exemplo 1 na coluna do sintetizador automático e foram adicionados nas mesmas condições de reacção utilizadas na fase (2) do Exemplo 1. Os aminoácidos utilizados são os referidos na Tabela 2 seguinte.

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430 g
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ala-OPfp	0.378
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Val-OPfp	0.400
Fmoc-L-Asp(0But)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp(0But)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Met-OPfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595

Após a reacção, a resina de peptide foi tratada pelo mesmo processo descrito na fase (2) do Exemplo 1 para se obterem cerca de 510 mg do peptide bruto.

(2) Purificação e formação de ligações de dissulfureto

Foi submetida uma parte (cerca de 450 mg) do péptido bruto à purificação e à formação de ligações de dissulfureto pelos mesmos procedimentos utilizados na fase (3) do Exemplo 1, tendo sido obtidos 32 mg do peptide purificado.

Exemplo 3

Síntese da calcitonina hibrida de análogo humano (1-16, Met⁸ → Val⁸)/enguia (17-32):

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-Gly-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Lys-Leu-Gln-
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Thr-Pro-NH₂
31 32

(1) Reacção de adição sequencial de aminoácidos

Foi introduzido 1 grama de resina BHA incorporando prolina preparada na fase (1) do Exemplo 1 na coluna de um sintetizador automático e foram adicionados aminoácidos nas mesmas condições da reacção utilizadas na fase (2) do Exemplo 1. Os aminoácidos utilizados são os referidos na Tabela 3 seguinte.

Tabela 3

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430 g
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ala-OPfp	0.378
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Val-OPfp	0.400
Fmoc-L-Asp(0But)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp(0But)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Val-OPfp	0.400
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595

Depois da reacção a resina de péptido foi tratada pelo mesmo processo descrito na fase (2) do Exemplo 1 para se obterem cerca de 580 mg do péptido bruto.

(2) Purificação e formação das ligações de dissulfureto.

Foi submetido uma parte (cerca de 500 mg do péptido bruto a purificação e formação de ligações de dissulfureto pelos mesmos procedimentos utilizados em (3) do Exemplo 1, tendo sido obtidos 35 mg do péptido purificado.

Exemplo 4

Síntese da calcitonina híbrida humana (1-16)/análogo de enguia (17-31, Des Leu¹⁹):

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Lys-Gln-Thr-

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Tyr-Phe-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-Thr-

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Phe-NH₂

31

(1) Reacção de adição sequencial de aminoácidos

Foi introduzido 1 grama da resina BHA incorporando prelina preparada na fase (1) do Exemplo 1

na coluna de um sintetizador automático e foram adicionados aminoácidos nas mesmas condições da reacção utilizadas na fase (2) do Exemplo 1. Os aminoácidos utilizados são os referidos na Tabela 4 seguinte:

Tabela 4

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430 g
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ala-OPfp	0.378
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Val-OPfp	0.400
Fmoc-L-Asp(0But)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp(0But)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Met-Opfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595

Após o fim da reação, o peptide resina foi tratado pelo mesmo processo descrito na fase (2) do Exemplo 1 para se obterem cerca de 520 mg do péptido bruto.

(2) Purificação e formação de ligações de dissulfureto

Foi submetida uma parte (cerca de 450 mg) do péptido bruto a purificação e formação de ligações de dissulfureto pelos mesmos procedimentos utilizados na fase (3) do Exemplo 1 tendo sido obtidos 23 mg do péptido purificado.

Exemplo 5

Síntese de calcitonina híbrida humana (1-13) / salmão (14-32):

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Thr-Tyr-Thr-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-Gln-

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Thr-Pro-NH₂

31 32

A síntese foi executada por um processo de síntese em fase sólida utilizando um sintetizador automático.

(1) Introdução da prolina em resina de benzidrilamina (BHA)

Foram suspensos dez gramas de resina BHA ($-\text{NH}_2$: 0,38 mmol/g) e agitados em 100 ml de DMF. Após remoção do sobrenadante, foram adicionados mais 100 ml de DMF, seguido da adição de BocProOH (19 mmol, DCC (19 mmol) e HOBT (19 mmol). A mistura foi agitada durante a noite à temperatura ambiente. Após filtração com um filtro de vidro, a resina resultante foi lavada com cloreto de metileno. Posteriormente, foram adicionados 200 ml duma solução de cloreto de metileno contendo 10% v/v de anidrido acético e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear os grupos amino individuais. Após o fim da reacção, a mistura foi lavada com cloreto de metileno e seca em vazio.

Após secagem, foram adicionados 50 ml numa solução de cloreto de metileno contendo 50% v/v de ácido trifluoroacético e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. Após a filtração com um filtro de vidro, a resina resultante foi lavada sucessivamente com cloreto de metileno, metanol, cloreto de metileno e trietilamina e seca em vazio.

Uma parte da resina resultante foi analisada com um analisador de aminoácido e verificou-se que tinham sido incorporados 0,31 mmol de prolina por grama de resina.

(2) Reacção de adição sequencial de aminoácidos

Foi introduzido 1 grama da resina obtida na fase (i) na coluna de um sintetizador automático e foram adicionados os aminoácidos em sequência nas seguintes condições.

- (1) reacção de adição: 30 min à temperatura ambiente em solvente DMF
- (ii) lavagem: 10 min à temperatura ambiente com DMF
- (iii) remoção de Fmoc: 10 min à temperatura ambiente com 20 v/v% de piperidina em solvente DMF
- (iv) lavagem: 10 min à temperatura ambiente com DMF

Repetindo as fases (i) - (4), foram adicionados 31 aminoácidos a seguir a Pro. Os aminoácidos utilizados são os referidos na Tabela 5 seguinte.

Tabela 5

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430 g
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Glu(OBut)-OPfp	0.468
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Met-OPfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	0.464
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	0.464

Após a reacção, foram removidos, a resina e os grupos protectores do péptido com fluoreto de hidrogénio e o péptido foi lavado com éter. O precipitado foi dissolvido numa solução aquosa a 50 v/v% de ácido acético e matéria insolúvel foi separada por filtração, O filtrado foi liofilizado para se obterem cerca de 720 mg do péptido bruto.

(3) Purificação e formação de ligações de dissulfureto

Foi dissolvida uma parte (cerca de 700 mg) do péptido bruto em água contendo 0,1 v/v% de TFA e a solução foi submetida a cromatografia líquida de alto rendimento numa coluna ODS.

Utilizando um sistema de solvente consistindo em água e acetonitrilo contendo 0,1% de TFA, a coluna foi eluida com um gradiente gradual de acetonitrilo aumentando de 20 v/v% até 30 v/v% a 40 v/v%, e as fracções a 30 v/v% foram eluidas e recolhidas e liofilizadas (purificação primária).

O péptido liofilizado (cerca de 80 mg) foi dissolvido em 80 ml de ácido acético a 0,05 v/v% e o pH da solução foi ajustado a 8,5 com amoníaco aquoso 3 M. Posteriormente, foram adicionados 1,5 ml de $K_3Fe(CN)_6$ 0,1 M e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 min para se obterem as ligações de dissulfureto. Após se ajustar o valor do pH a 5,0 com ácido acético a 50% v/v 50 v/v% foi adicionada uma resina de permuta aniónica (forma Cl^-) e a mistura foi agitada durante 20 min, seguido de separação por filtração da resina.

O filtrado foi concentrado e submetido de novo a cromatografia líquida de alto rendimento numa coluna de ODS, que foi eluída com o mesmo sistema de solventes

utilizado na purificação primária em gradientes de densidade gradual de acetonitrilo desde 25, 27 até 30 a 35 v/v% (purificação secundária). As frações a 30 v/v% de eluição foram recolhidas e liofilizadas para se obterem 53 mg do péptido do título.

Exemplo 6

Síntese da calcitonina híbrida (1-21) humana)/22-32) salmão:

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-His-

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-Gly-

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Thr-Pro-NH₂

31 32

Foi introduzido 1 grama de resina BHA incorporando prolina preparada na fase (1) do Exemplo 5 na coluna de um sintetizador automático e foram adicionados os aminoácidos nas mesmas condições de reacção utilizadas na fase (2) do Exemplo 5. Os aminoácidos utilizados são os referidos na Tabela 6 seguinte.

Tabela 6

Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430 g
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Arg(Mtr)-OPfp	0.641
Fmoc-L-Pro-OPfp	0.400
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-His(Boc)-OPfp	0.510
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Lys(Boc)-OPfp	0.503
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-L-Phe-OPfp	0.438
Fmoc-L-Asp(0But)-OPfp	0.457
Fmoc-L-Gln-OPfp	0.423
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Tyr(But)-OPfp	0.495
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Met-OPfp	0.426
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595
Fmoc-L-Thr(But)-ODhbt	0.430
Fmoc-L-Ser(But)-ODhbt	0.419
Fmoc-L-Leu-OPfp	0.411
Fmoc-L-Asn-OPfp	0.412
Fmoc-Gly-OPfp	0.367
Fmoc-L-Cys(Trt)-OPfp	0.595

Após a reacção, o péptido-resina foi tratado pelo mesmo processo utilizando na fase (2) do Exemplo 5 para se obterem cerca de 860 mg de péptido bruto.

(2) Purificação e formação de ligações de dissulfureto

Uma parte (cerca de 850 mg) de péptido bruto foi submetida a purificação e formação de ligação de dissulfureto pelos mesmos procedimentos utilizados na fase (3) do Exemplo 5.

O filtrado resultante foi concentrado e submetido de novo a cromatografia de alto rendimento numa coluna ODS, que foi eluída com o mesmo sistema solvente utilizado na purificação primária a ingredientes de densidade gradual de acetonitrilo desde 24 a 35 v/v% até 26, 28 e 30 v/v% (purificação secundária). As fracções a 28 v/v% de eluição foram recolhidas e lyophilizadas para se obterem 66 mg de peptido pretendido.

Exemplo 7

Análise da composição de aminoácidos

Cada uma das calcitoninas purificadas nos Exemplos 1 a 6 foi hidrolisada a 150°C durante 1 hora na presença de HCl 6N, e a composição em aminoácidos foi analisada com um analisador de aminoácidos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7

<u>Aminoácido</u>	<u>Exemplo 1</u>	<u>Exemplo 2</u>	<u>Exemplo 3</u>	<u>Exemplo 4</u>	<u>Exemplo 5</u>	<u>Exemplo 6</u>
Asx	3.14(3)	3.12(3)	3.12(3)	3.17(3)	2.11(2)	4.50(4)
Thr	6.43(7)	5.32(6)	5.44(6)	5.65(6)	6.37(7)	6.86(7)
Ser	1.79(2)	0.85(1)	0.82(1)	0.84(1)	1.71(2)	1.64(2)
Glx	2.34(2)	2.26(2)	2.35(2)	2.28(2)	3.49(3)	1.00(1)
Gly	4.14(4)	4.20(4)	4.14(4)	4.08(4)	4.01(4)	4.57(4)
Ala	0 (0)	1.01(1)	1.02(1)	0.96(1)	0 (0)	0 (0)
Val	0 (0)	1.07(1)	2.01(2)	1.12(1)	0 (0)	0 (0)
Met	0.97(1)	0.98(1)	0 (0)	0.90(1)	1.01(1)	0.93(1)
Leu	3.15(3)	3.11(3)	3.10(3)	2.03(2)	4.28(4)	2.00(2)
Tyr	2.02(2)	2.06(2)	2.02(2)	2.06(2)	2.12(2)	2.01(2)
Phe	1.04(1)	1.06(1)	1.04(1)	1.07(1)	0 (0)	2.07(2)
His	1.02(1)	1.03(1)	1.12(1)	1.08(1)	1.05(1)	0.80(1)
Lys	1.03(1)	1.04(1)	1.02(1)	1.06(1)	1.05(1)	0.92(1)
Arg	1.01(1)	1.00(1)	0.98(1)	0.99(1)	0.99(1)	0.85(1)
Pro	1.97(2)	1.92(2)	1.95(2)	1.69(2)	1.84(2)	2.06(2)

Nota: Os valores teóricos estão entre parêntesis

Exemplo 8

Determinação das actividades biológicas.

As seis novas calcitoninas preparadas nos Exemplos 1 a 6 foram dissolvidos numa solução tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 4,2) contendo 0,1% de BSA (albumina de soro de bovino) e foram injectadas em ratos macho SD (com 4 semanas de idade) em pré-jejum (24 horas) através da veia da cauda. Passada 1 hora, a concentração do cálcio no soro foi medida pelo processo OCPC (Calcium C - Test Wako of Wako Pure (Chemical Industries, Ltd.).

A actividade da calcitonina que provocava uma queda de 10% na concentração de cálcio no soro foi determinada como sendo 10 mU, e o número de unidades por miligrama de calcitonina foi designado por "actividades específica". Os resultados obtidos são os apresentados na Tabela 8.

Tabela 8

<u>Novas calcitoninas</u>	<u>Actividade específica (U/mg)</u>
Exemplo 1	2106*
2	2639
3	2262
4	2611
5	2575
6	1792

* Média para duas medidas

Exemplo 9

Eficiência das calcitoninas contra a hipercalcemia

Processo:

Foi administrada vitamina D3 (5 mg/kg) oralmente a ratos machos Sd de 5 semanas de idade durante 4 dias consecutivos para construir modelos experimentais de ratos hipercalcimicos. No dia 5, foram injectados calcitonina híbrida (1-16) humana / (17-32) salmão (calcitonina híbrida 1), calcitonina de salmão e calcitonina humana subcutâneamente, cada numa quantidade de 4 UI/kg. Foi extraído sangue em intervalos de tempo determinados e foi medida a concentração de cálcio do plasma.

Resultados obtidos e sua discussão:

As curvas em função do tempo das concentrações de cálcio no plasma para as calcitoninas de ensaio são apresentadas na Figura 1. Como se pode ver da Figura 1, toda a calcitonina 1, calcitonina de salmão e calcitonina humana ensaiados provaram uma redução rápida na concentração elevada de cálcio no sangue. É assim óbvio que a calcitonina híbrida da presente invenção é tão eficaz como a calcitonina de salmão e a calcitonina humana contra a hipercalcemia.

Exemplo 10

Efeito analgésico das calcitoninas

Processo:

1) Animal

Foram utilizados 10 coelhos machos (Kbl:JW) pesando 2,7 a 3,2 kg.

(ii) Implantação de uma cânula de guia para a administração intraventricular.

Os coelhos foram presos numa dispositivo estereotáxico com anestesia com pentobarbital (30 mg/kg, i.v.). Após o escalpe ter sido incisado, foi inserida uma cânula de guia para administração intraventricular (Plastic Products) no ventrículo lateral esquerdo de cada animal e foi fixada com cimento dental (coordenadas estereotáxicas de bregma: posterior 4,0 mm; lateral, 5,5 mm; ventral, 5,5 mm). Passada uma semana de convalescência, os coelhos foram submetidos às experiências descritas a seguir. Após a experiência, foi injectado azul de metileno para verificar a coloração da cânula.

(iii) Ensaio de antinocicepção

Os coelhos foram reunidos com um retenedor de coelhos e foi aberto um furo com um diâmetro de 1 mm e uma profundidade de 1 mm em ambas as partes laterais de um incisor maior superior com uma broca de dentista. Foi montado um eléctrodo estimulante em cada furo e foi aplicada uma estimulação eléctrica (5 ms, 5 Hz, 3 s de duração) a várias tensões a partir do um estimulador eléctrico (Nihon Kohden Corp) para medir os valores limites da estímulação (D) que induzem respostas de lambimento (lambimento e o movimento dos lábios e da maxila inferior) nos animais. Foram conduzidas as medidas uma hora antes da administração do medicamento e, imediatamente após a administração, bem como 0,5 h, 1,0 h, 1,5 h, 2,0 h, 3,0 h e 4,0 h após a administração.

Os medicamentos ensaiados foram a calcitonina híbrida (1-16) humana/(17-32) de salmão (calcitonina híbrida 1) calcitonina de salmão e calcitonina humana, cada uma das quais foi administrada ventricularmente numa quantidade equivalente a 8 UI/kg. A solução salina fisiológica foi utilizada como controlo.

• Resultados e discussão:

As curvas da dependência do tempo dos valores limites de estimulação para as calcitoninas de ensaio são apresentadas na Figura 2. Como se pode observar na Figura 2, as três calcitoninas provocavam aumentos comparáveis no valor limite que atingia o máximo de 0,5 - 1,5 horas após a administração do medicamento. É portanto estimulado que a calcitonina híbrida da presente invenção é tão eficaz como a calcitonina de salmão e a calcitonina humana na sua ação analgésica.

Exemplo 11

Efeitos das calcitoninas na inibição do ganho de peso corporal e do apetite

Processo:

Foram injectados intramuscularmente ratos com calcitonina híbrida (1-16) humana/(17-32) de salmão (calcitonina híbrida 1), calcitonina humana e calcitonina de enguia, e foram medidos os seus pesos corporais e consumos de alimentos passados 24 horas.

Resultados obtidos:

As alterações no peso corporal dos ratos administrados com várias calcitoninas são apresentadas na Figura 3, e os seus consumos de alimentos na Figura 4. Cada uma das calcitoninas foi administrada em três doses diferentes: 12,5 UI/kg, 50 UI/kg e 200 UI/kg. Para as alterações do peso corporal, os pesos medidos foram calculados em média para 5 ratos, e para o consumo de alimentos foram adicionados em conjunto os valores medidos para 5 ratos.

Discussão:

Como é óbvio a partir das Figuras 3 e 4, a calcitonina de salmão e a calcitonina de enguia apresentavam

efeitos dependentes da dose na inibição do ganho do peso corporal e do apetite, enquanto que a calcitonina híbrida de 1 e a calcitonina humana não provocavam alterações no peso corporal e no consumo de alimentos. Pode assim concluir-se que a calcitonina híbrida da presente invenção provoca efeitos tão pequenos no ganho de peso do corpo e no apetite como a calcitonina humana:

Exemplo 12

Efeito das calcitoninas no tempo de esvaziamento gástrico

Processo:

Cadelas beagles em jejum desde o dia anterior foram injectadas com calcitonina híbrida (1-16) humana/(17-32) de salmão (calcitonina híbrida 1) calcitonina de salmão, calcitonina humana e solução solina fisiologica através de uma veia encefálica. Passa-se uma hora foram administrados oralmente, comprimidos de aspirina entéricos (contendo 200 mg do ingrediente activo) juntamente com 25 ml de água. Em seguida, foram tomadas amostras sanguíneas da outra veia encefálica a determinados intervalos de tempo e no plasma obtido da maneira habitual foi armazenada a -20°C até às medidas serem efectuadas.

A medida que passa através da parede intestinal, a maior parte da aspirina ingerida é metabolizada e entra no fluxo sanguíneo como ácido salicílico. Assim, o ácido salicílico no plasma foi determinado como marcador para a aspirina. Foi adicionado etanol (200 µl) a 50 µl de plasma e a mistura foi centrifugada a 10 000 rpm x 1 min, sendo o sobrenadante resultante submetido a HPLC.

Resultados obtidos:

-
-
-

A acção de retardamento de cada calcitonina no esvaziamento gástrico é resumida na Tabela 9. A diferença entre o tempo para a administração de solução salina fisiologica em relação à absorção de aspirina foi calculada para cada animal para determinar o atraso no tempo de esvaziamento gástrico.

Tabela 9

<u>Calcitonina</u>	<u>Dose,</u> <u>ug (UI) /kg</u>	<u>Tempo de absorção</u> <u>h</u>	<u>tempo de atraso</u> <u>h</u>
Calcitonina híbrida	0.6 (1.2)	1.9	4.8
1	10 (21.0)	5.1	18.0

0.1 (0.4)	2.0	2.0	0.3
0.3 (1.2)	2.7	4.5	11.1
0.6 (2.4)	22.0	30.0	45.0

Calcitonina de salmão	6 (1.2)	3.0	3.9
	100 (20.0)	5.0	6.9
Calcitonina humana			

Notas **Tempo de Absorção:** é o tempo desde a administração de aspirina até a sua absorção

Tempo de atraso: diferença no tempo da absorção de aspirina entre calcitonina e a solução salina fisiológica

Discussão:

Como a Tabela 9 mostra, a calcitonina de salmão tinha uma acção muito forte no atraso do tempo de esvaziamento gástrico enquanto que a calcitonina humana era fraca nessa acção. A calcitonina híbrida 1 era mais parecida com a calcitonina humana do que a calcitonina de salmão no atraso do tempo de esvaziamento gástrico. Pode ser assim concluído que a calcitonina híbrida 1 da presente invenção pode ser administrada em doses mais elevadas de unidades de actividade do que a calcitonina de salmão.

Exemplo 13

Efeitos das calcitoninas na motilidade gástrica intestinal no cão consciente.

Processo:

Foi anestesiado um cão beagle saudável pesando cerca de 10 kg com uma injecção i.v. de pentobarbital de sódio e a cavidade abdominal foi aberta em condições assépticas.

Foram suturados transdutores de força extraluminal na serose do antro gástrico do estômago duodeno e jejum para medir a contração muscular circular, tal como referido anteriormente (Itoh e col. Gastroenterol Jpn, 12, 275 1977)).

Os cabos de ligação destas sondas estavam fora da cavidade abdominal e em seguida foram ligadas através de incisão na pele feita entre as escápulas.

Após a cirurgia abdominal, foi feita uma incisão na pele longitudinal de 5 cm no pescoço frontal direito para expor a veia jugular externa.

Foi colocado um tubo Silástico (tamanho francês 8,5 Dow Corning, Midland, MI) na veia cava superior através da veia e suturado na pele adjacente como guia para a injeção intravenosa dos medicamentos de ensaio.

Após a operação foi colocada uma camisa protectora no cão para proteger os cabos de ligação e o tubo silástico.

O cão foi metido numa caixa individual experimental, e foi-lhe dado alimento comercial para cães às 5,00 da tarde e foi dada água à vontade.

Foi registada a actividade motora gastro-intestinal num registador de penas de camisa térmica (WR-3101, Graphtic, Tóquio, Japão) ligando os cabos de ligação das sondas aos cabos de ligação dos amplificadores (UG-5, Nihon Kohden, Tóquio, Japão).

Cerca de duas semanas após a operação, a actividade contrátil gastro-intestinal podia ser dividida em dois padrões de actividade principais, estado interdigestivo e digestivo.

No estado interdigestivo, observaram-se IMC (complexo motor migrante interdigestivo) que ocorria em intervalos regulares de 100 a 120 min durante no antro gástrico, e a que migravam através do duodeno e do jejun a uma velocidade constante.

Em todos os animais, a alimentação fazia parar o padrão de IMC regular. Foram efectuadas experiências durante o estado interdigestivo, O medicamento foi dissolvido em solução salina a 0,9% e foi administrado através de um tubo Silástico interior durante cerca de 10 segundos num volume de 0,3 ml/kg.

15 minutos após o fim de IMC no antro gástrico, este foi posteriormente lavado com uma solução salina a 0,9%.

Foi medido o tempo até ao próximo IMC desde a administração do medicamento, e foi utilizado como índice para a actividade inibidora do medicamento na motilidade gastro-intestinal.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

Resultados:

Tabela 10

	Calcitonina de salmão	Dose, ug/kg (U/kg)	0.1 (0.4)	0.3 (1.2)	1.0 (4.0)	3 (12)
	IMC atraso	0	1	2	3	
45	Calcitonina humana	Dose, ug/kg (U/kg)	100 (20)	300 (60)	1000 (200)	
-	IMC atraso	0	0.5	0.5		
1	Calcitonina Híbrida	Dose, ug/kg (U/kg)	0.03 (0.06)	0.1 (0.21)	1.0 (2.1)	3.0 (6.3)
-	IMC atraso	0	0.5	1	1	1
2	Calcitonina híbrida	Dose, ug/kg (U/kg)	0.3 (0.5)	1.0 (1.8)	3.0 (5.4)	10 (18)
-	IMC atraso	0	0.5	1	1	1

Notas: 1. Os índices de "atraso IMC" significam o seguinte.
0... O próximo IMC ocorria 180 min após a administração.
0,5... O próximo IMC ocorria mais de 180 min mas num período de 300 min após a administração.
1... O próximo IMC ocorria um dia após a administração.
2... O próximo IMC ocorria dois dias após a administração.
3... O próximo IMC ocorria três dias após a administração.
2. A calcitonina híbrida era a calcitonina (1-16) humana/(17-32) de salmão e a calcitonina híbrida 2 era a calcitonina (1-21) humana/(22-32) de salmão.

Discussão:

Tal como referido na tabela 10, a calcitonina de salmão administrada intravenosamente de forma dependente de dose inibia a ocorrência do próximo IMC num cão consciente.

Para uma dose de 3 ug/kg, atravasa a ocorrência de IMC de 3 dias. Por outro lado, a calcitonina humana tinha um efeito muito pequeno no IMC.

Embora as calcitoninas híbridas também inibissem o IMC, estes compostos atrasavam a ocorrência do próximo IMC apenas 1 dia mesmo na maior dose examinada (100 ug/kg).

Estes resultados demonstram definitivamente que as calcitoninas híbridas tinham um efeito mais fraco na motilidade gastro-intestinal em cães conscientes do que a calcitonina de salmão.

Estes resultados também indicavam que as calcitonininas híbridas causarão provavelmente menos efeitos adversos no sistema gastro-intestinal provavelmente menos efeitos adversos no sistema gastro-intestinal do que a calcitonina de salmão.

Exemplo 14

Reacção cruzada entre anticorpos de calcitonina humana antisalmão e calcitonina híbrida.

Processo:

Foi sintetizado calcitonina de salmão por um procedimento vulgar de síntese em fase sólida. A calcitonina de salmão marcada com ^{125}I foi preparada pelo processo de Tejedor (Tejedor, F. e Ballesta, J.P.G.; *Analytical Biochemistry*, 127, 143-149 (1982)).

Verificou-se que quatro tipos de soro humano continham anticorpos após a administração de calcitonina de salmão que tinha sido fornecida de Dr. Frederik R. Singer (CEDERS-SINAI MEDICAL CENTER). Os teores de anticorpos destes soros contra a calcitonina de salmão são os seguintes:

No. 1 1 : 4000 No. 2 1 : 8000
No. 3 1 : 8000 No. 4 1 : 2000

1) Determinação da proporção da difusão do soro

Foi utilizada como tampão de reacção uma solução tampão de borato 0,1 M (pH 8,0) contendo 0,5% de BSA, 0,9% de NaCl, e 0,05% de Tween 20. Este tampão de reacção, soro de calcitonina humana anti-salmão (diluído com o tampão de reacção até uma diluição final de 100-6 400) e uma solução de calcitonina marcada foram carregados num tubo auxiliar (do tipo Spitz de Saschted Inc. medindo 12 x 75 mm) nos volumes respectivos que se mostram em seguida, bem agitados, e deixados em repouso durante a noite à temperatura ambiente.

		* 1	* 2
i)	Tampão de reacção	300 μl	400 μl
ii)	Soro de calcitonina humana anti-salmão	100 μl	0 μl
iii)	Solução de calcitonina marcada (\approx 20 000 cpm)	100 μl	100 μl

- * 1 Ligação total (B)
- * 2 Ligação específica (NSB)

A solução de reacção foi bem misturada com 500 μ l de BGG a 0,2% (γ -globulina de bovino, Sigma), misturada ainda com 1 ml de PEG 6000 a 25%, bem agitada e em seguida deixada em repouso à temperatura ambiente durante 15 min. A solução reaccional foi em seguida centrifugada numa centrifugadora de tipo succão (O5RP-22 da Hitachi) a 3 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Após se remover o sobrenadante por aspiração. foi medida a radioactividade com um contador de raios gama. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 5.

- 2) Reacção de competição entre a calcitonina de salmão marcada com ^{125}I e a calcitonina humana ou calcitonina hibrida.

O tampão da reacção, vários tipos de calcitonina, soro de calcitonina humana anti-salmão e a solução de calcitonina marcada foram carregados num tubo auxiliar nos volumes respectivos indicados a seguir e tratados posteriormente da mesma forma como na determinação da diluição do soro.

		*1	*2	*3
i)	Tampão de reacção	200 μ l	400 μ l	300 μ l
ii)	Calcitonina	100 μ l	0 μ l	0 μ l
iii)	Soro de calcitonina humana anti-salmão	100 μ l	0 μ l	100 μ l
iv)	Solução de calcitonina marcada (\approx 20.000 cpm)	100 μ l	100 μ l	100 μ l
		(B')	(NSB)	(Bo')

As duas calcitoninas hibridas utilizadas foram: 1. calcitonina (1-16) humana/(17-32) salmão;

2. calcitonina (1-21) humana/(22-32) salmão.

Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 6 a 9.

Resultados obtidos e discussão:

Foi feita uma investigação para se saber se a calcitonina de salmão marcada com ^{125}I competia com a calcitonina de salmão para o soro de calcitonina humana anti-salmão Nº 1 (Figura 5). Foram obtidas curvas semelhantes quando foram utilizados os soros de calcitonina humana anti-salmão Nºs. 2 a 4. Estes resultados indicam que a calcitonina de salmão começavam a competir com a calcitonina de salmão marcada para uma dose de pelo menos 1 mg/ml.

As experiências efectuadas com os 4 tipos de soro demonstraram que nenhuma das calcitoninas hibridas 1 ou 2 era reconhecida pelo soro de calcitonina humana anti-salmão (Figuras 6 a 9).

Pode assim concluir-se que a calcitonina hibrida da presente invenção pode ser potencialmente utilizada como medicamento eficaz para pacientes que produzem anticorpos de calcitonina anti-salmão.

A calcitonina hibrida da presente invenção tem a vantagem especial de apresentar actividades biológicas tão fortes como as da calcitonina de salmão, enguia e galinha embora não causem efeitos laterais incluindo náuseas, problemas nas funções do sistema digestivo e antigenicidade. Tem também uma vantagem processual em que as reacções laterais que podiam de outra forma ser encontradas durante a síntese podem ser agora evitadas alterando a Met⁸ em calcitonina humana para Val⁸.

•
•
•

REIVINDICAÇÕES

- 1^a -

Processo para a preparação de uma calcitonina híbrida caracterizado por se incorporarem dois segmentos de péptido, sendo um deles um segmento de péptido em calcitonina humana ou um seu análogo que se encontra localizado no lado mais próximo da extremidade do terminal de amino, e sendo o outro um segmento de péptido em calcitonina derivada de um animal diferente do homem e se que se encontra localizado no lado mais próximo da extremidade do terminal de carboxi.

- 2^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida em que o segmento de péptido que se encontra na parte localizada no lado mais próximo da extremidade do terminal de amino compreende pelo menos 10 resíduos de aminoácidos em calcitonina humana e o segmento de péptido que se encontra na parte localizada no lado mais próximo da extremidade do terminal de carboxi compreende pelo menos 6 resíduos de aminoácidos em calcitonina derivada de um animal diferente do homem.

- 3^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida em que a calcitonina humana é calcitonina humana nativa ou um seu análogo e a calcitonina derivada de um animal diferente do homem é calcitonina nativa ou um seu análogo.

- 4^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida em que a calcitonina não humana é derivada de enguia, salmão ou galinha.

- 5^a -

Processo para a preparação de uma calcitonina híbrida caracterizado por se incorporar um segmento de péptido em calcitonina humana e um segmento de péptido em calcitonina derivada de um animal diferente do homem, compreendendo o primeiro segmento de péptido resíduos de aminoácidos desde o primeiro até ao de ordem n ($n = 10 - 28$) a partir do terminal de amino e compreendendo o segundo segmento de péptido os resíduos de aminoácidos subsequentes na direcção do terminal de carboxi.

- 6^a -

Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida em que o primeiro segmento de péptido compreende resíduos de aminoácidos desde o primeiro até ao de ordem n ($n = 13 - 21$) a partir do terminal de amino e é ou um segmento de péptido em calcitonina humana nativa ou um segmento de péptido num análogo de calcitonina humana possuindo não mais do que dois resíduos de aminoácidos substituídos por, eliminados de ou adicionados ao segmento de péptido em calcitonina humana nativa.

- 7^a -

Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida em que o segmento de péptido num análogo de calcitonina humana possui um resíduo de valina substituído pelo oitavo resíduo de metionina em calcitonina humana nativa.

- 8^a -

Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida em que o segundo segmento de péptido compreende os resíduos de aminoácidos de ordem n ($n = 14 - 22$) e subsequentemente a partir do terminal de amino de calcitonina de enguia, salmão ou galinha e é ou um segmento de péptido em calcitonina nativa de enguia, salmão ou galinha ou um segmento de péptido num análogo de calcitonina não possuindo mais do que três resíduos de aminoácidos substituídos por, eliminados de ou adicionados ao segmento de péptido em calcitonina nativa de enguia, salmão ou galinha.

- 9^a -

Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida em que o segundo segmento de péptido é um segmento de péptido em calcitonina nativa de enguia ou salmão ou é um segmento de péptido num análogo de calcitonina possuindo um resíduo de aminoácido substituído por ou eliminado do segmento de péptido em calcitonina nativa de enguia ou salmão.

- 10^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida em que a sequência dos resíduos de aminoácidos desde o primeiro até ao decimo sexto a partir do terminal de amino é a mesma dos resíduos de aminoácidos desde o primeiro até ao décimo sexto de calcitonina nativa humana, e a sequência dos resíduos de aminoácidos desde o décimo sétimo até ao trigésimo segundo é a mesma dos resíduos de aminoácidos desde o décimo sétimo até ao trigésimo segundo em calcitonina nativa de enguia ou salmão.

- 11^a -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida possuindo a seguinte fórmula estrutural:

H-Cys-Cly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met (ou Val)-Leu-Gly-

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp (ou Glu)-Phe (ou Leu)-Asn (ou His)-
11 12 13 14 15 16 17

Lys-Phe (ou Leu ou Des)-His (ou Gln)-Thr-Tyr-Pro-Arg-
18 19 20 21 22 23 24

Thr-Asn (ou Asp)-Thr (ou Val)-Gly-Ser (ou Ala)-Gly-Thr-
25 26 27 28 29 30 31

Pro-NH₂.

32

Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida possuindo a seguinte fórmula estrutural:

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-
Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Lys-Leu-
Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-
Gly-Thr-Pro-NH₂;

Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se obter uma calcitonina híbrida possuindo a seguinte fórmula estrutural:

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-
Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Lys-Leu-
Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-
Gly-Thr-Pro-NH₂;

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-
Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Lys-Leu-
Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-
Gly-Thr-Pro-NH₂;

[Handwritten signature]

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-
Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Lys-Gln-
Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-Gly-
Thr-Pro-NH₂;

N-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-
Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Glu-Leu-His-Lys-Leu-
Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-
Gly-Thr-Pro-NH₂; e

H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-
Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-Asn-Lys-Phe-
His-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asn-Thr-Gly-Ser-
Gly-Thr-Pro-NH₂.

- 14^a -

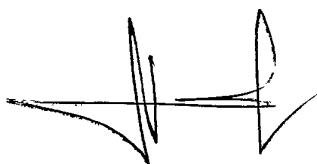
Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 13 caracterizado por se sintetizar o péptido possuindo uma sequência da referida calcitonina (híbrida) por meio de uma síntese em fase sólida ou uma síntese em fase líquida e se formar a ligação de dissulfureto do referido péptido em qualquer fase desejada da síntese da referida calcitonina (híbrida).

•
•
•

Processo de acordo com a reivindicação
14 caracterizado por se sintetizar completamente o péptido
possuindo uma sequência da referida calcitonina (híbrida)
com a excepção de não se ter formado a ligação de dissulfuro-
reto e em seguida se formar a ligação de dissulfureto.

A requerente reivindica as prioridades
dos pedidos de patente japoneses apresentados em 9 de Abril
de 1990 e em 1 de Setembro de 1990, sob os n.os 93656/1990 e
231913/1990, respectivamente.

Lisboa, 9 de Abril de 1991

A handwritten signature consisting of two stylized loops connected by a horizontal line, positioned below the date.

RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA CALCITONINA HÍBRIDA"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de uma calcitonina híbrida que compreende incorporarem-se dois segmentos de péptidos, sendo um deles um segmento de péptido em calcitonina humana ou um seu análogo que se encontra localizado no lado mais próximo da extremidade do terminal de amino, e sendo o outro um segmento de péptido em calcitonina derivada de animal diferente do homem e que se encontra localizado no lado mais próximo da extremidade do terminal de carboxi.

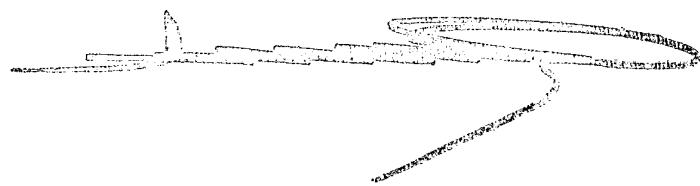
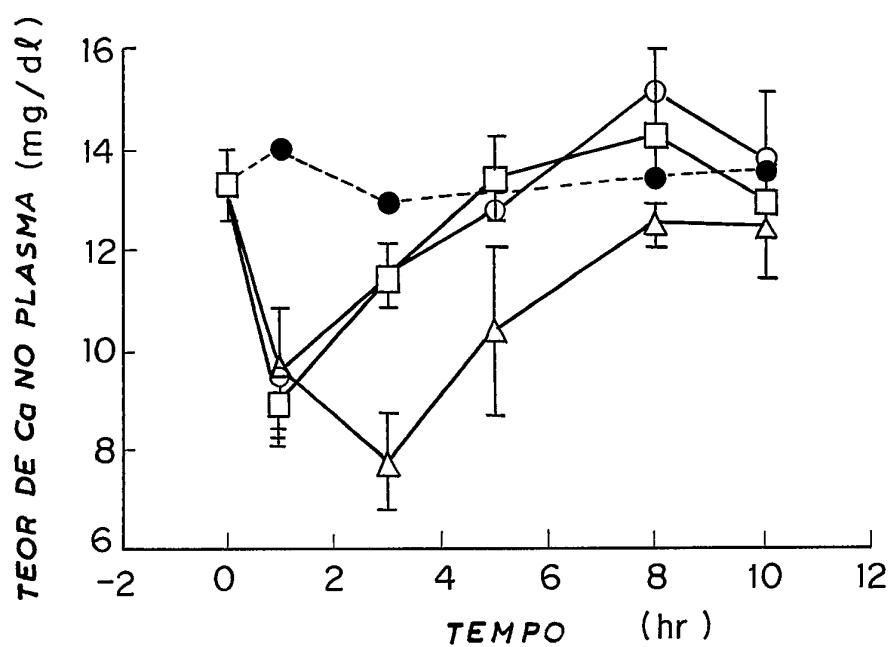


Fig. 1



- ● --- **CONTROLO**
- ○ — **CALCITONINA 1**
- △ — **CALCITONINA DE SALMÃO**
- □ — **CALCITONINA HUMANA**

Fig. 2

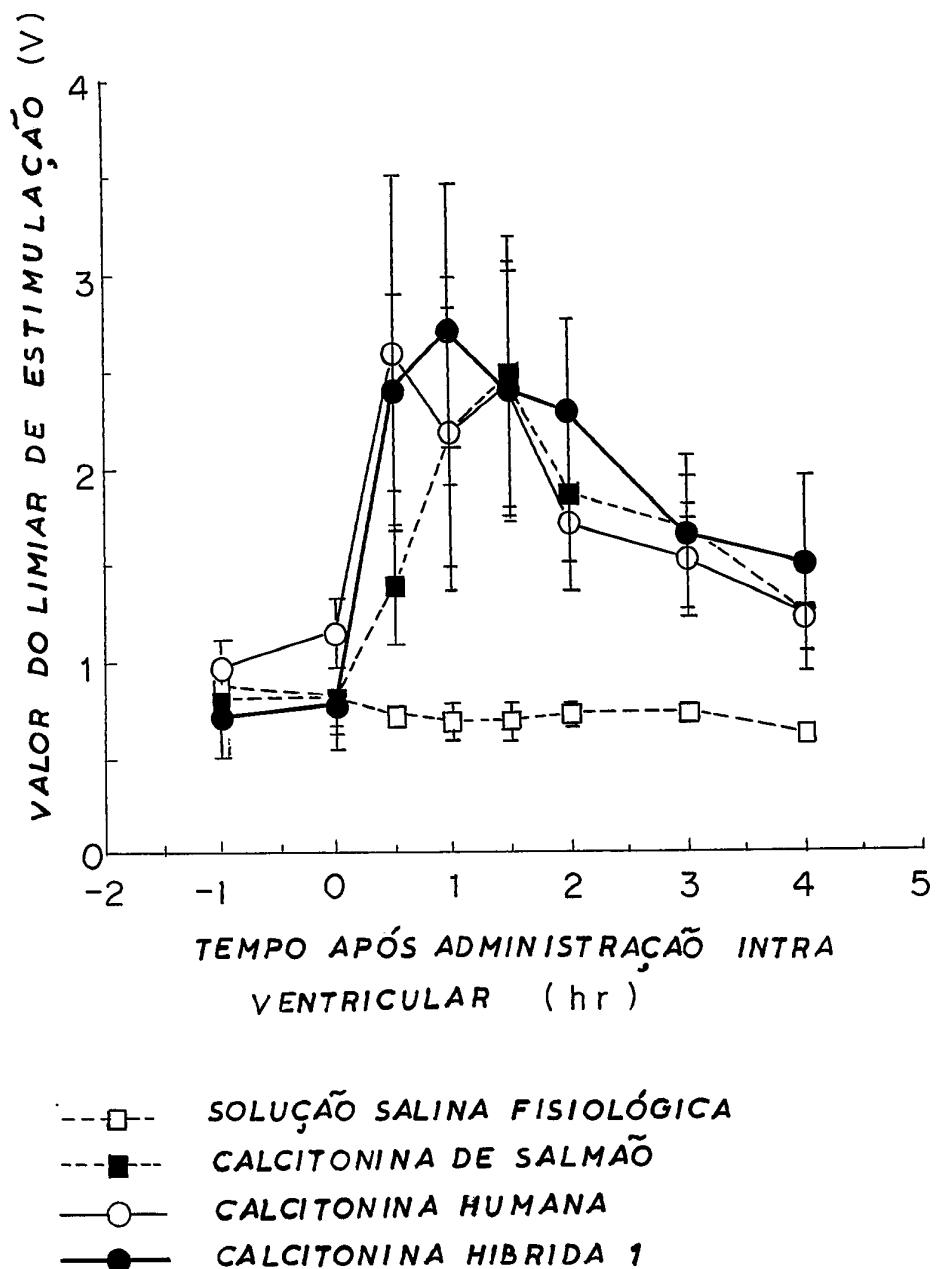


Fig. 3

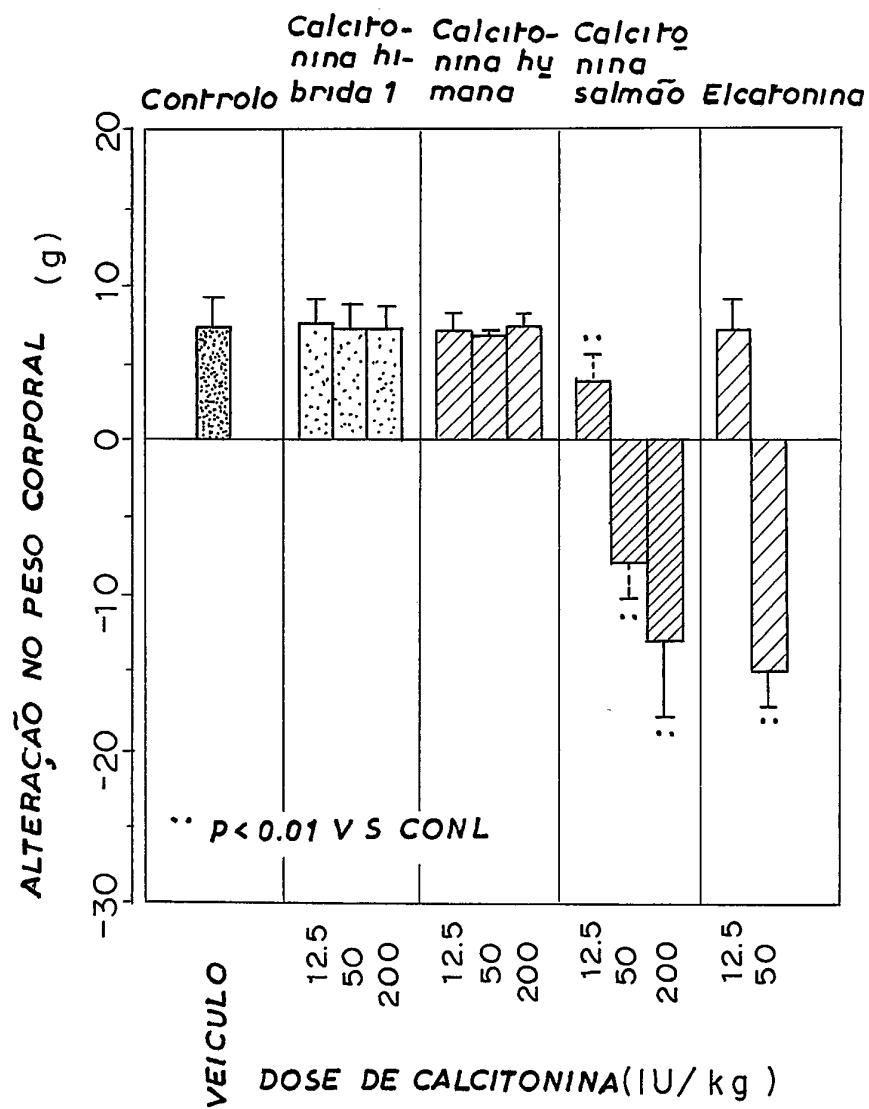


Fig. 4

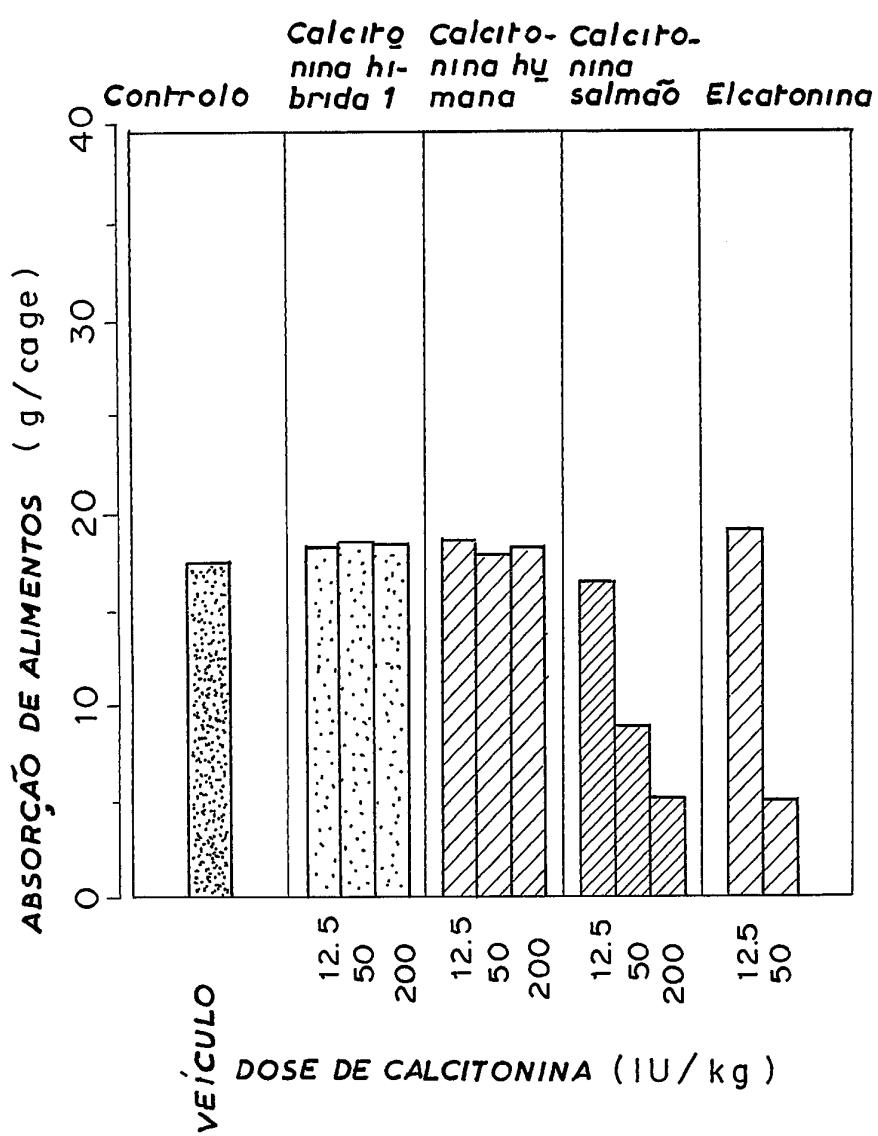


Fig. 5

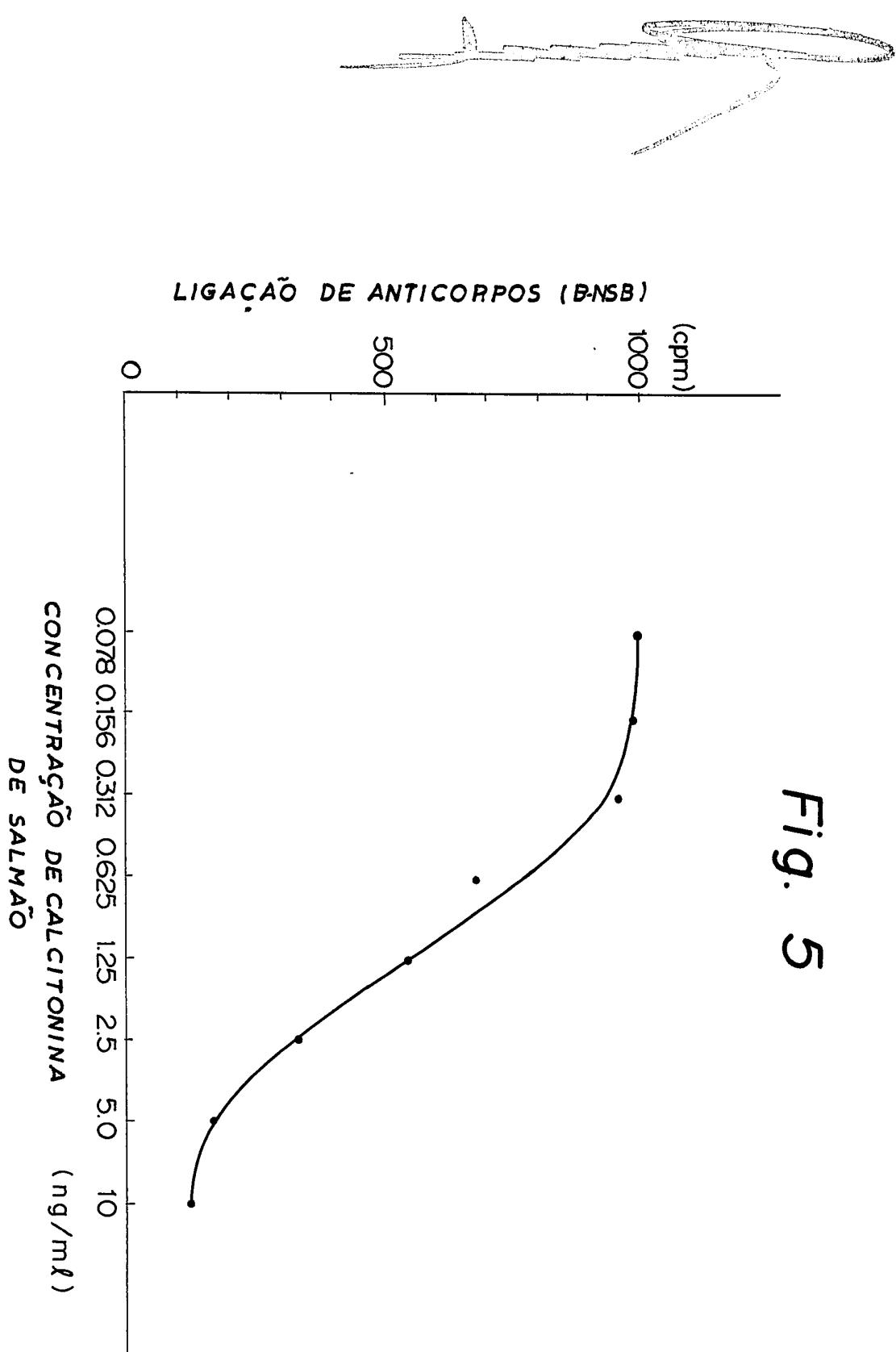
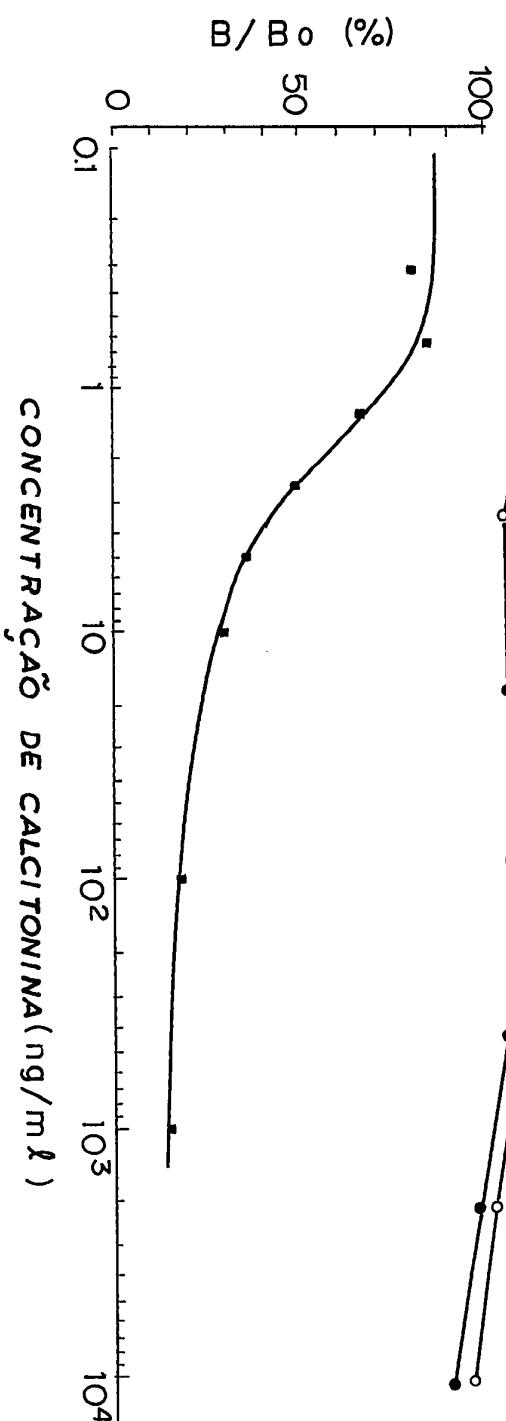


Fig. 6

① SORO NO. 1

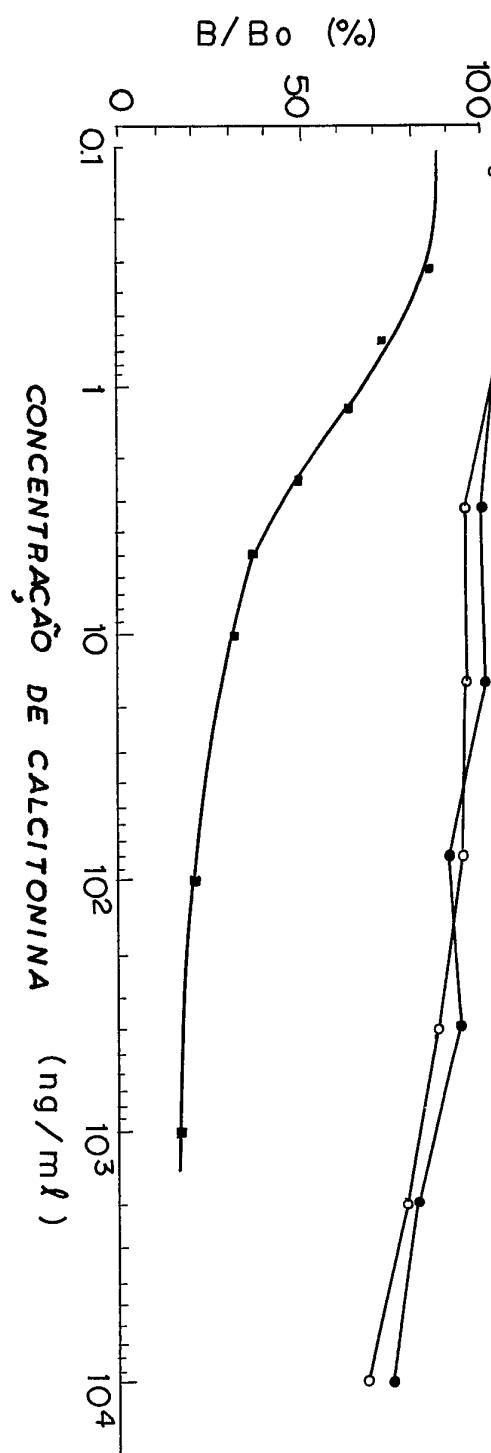


$$B/B_0 = \frac{B' - NSB}{Bo' - NSB} \times 100 (\%)$$

CALCITONINA HIBRIDA 1
—○—
CALCITONINA HIBRIDA 2
—●—
CALCITONINA DE SALMAO
■—

Fig. 7

② SORO NO. 2



$$B/B_0 = \frac{B' - \text{NSB}}{\text{Bo}' - \text{NSB}} \times 100(\%)$$

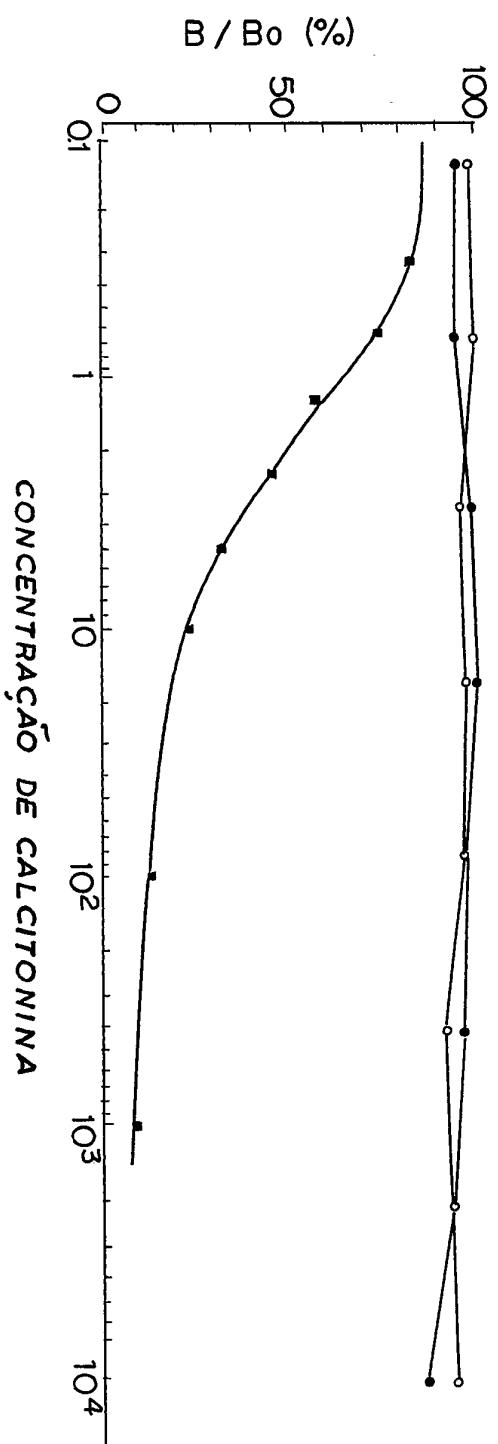
CALCITONINA DE SALMAO

CALCITONINA HIBRIDA 1

CALCITONINA HIBRIDA 2

Fig. 8

③ SORO NO. 3



CALCITONINA HIBRIDA 1



CALCITONINA HIBRIDA 2



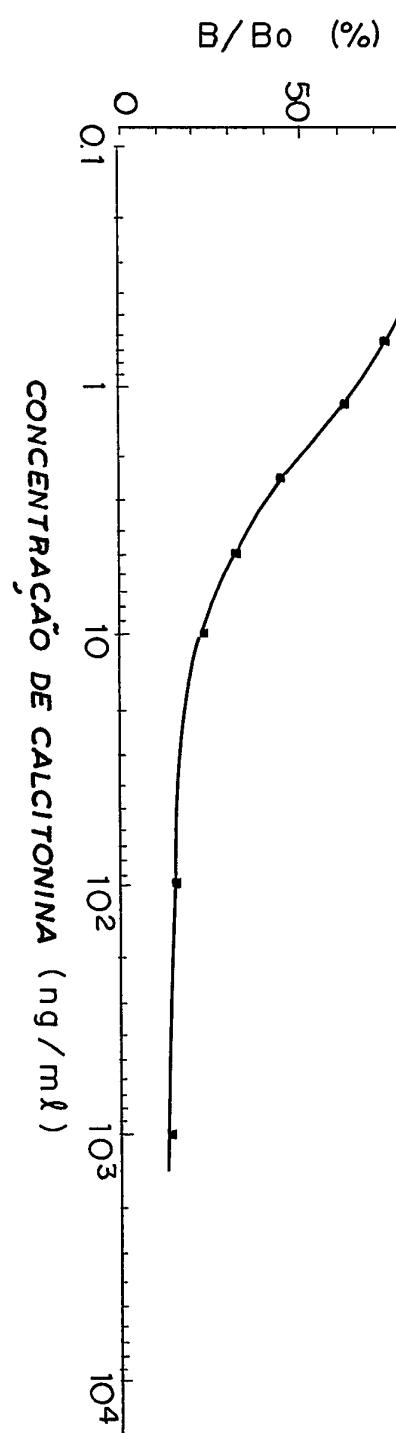
CALCITONINA DE SALMÃO



$$B / B_0 = \frac{B' - NSB}{B_0' - NSB} \times 100 (\%)$$

Fig. 9

④ SORO NO. 4



$$B / B_0 = \frac{B' - NSB}{B'_0 - NSB} \times 100 \text{ (\%)} \\$$

CALCITONINA DE SALMÃO

CALCITONINA HIBRIDA 1

CALCITONINA HIBRIDA 2