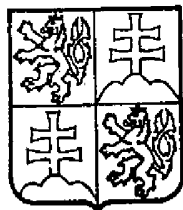


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(21) 00894-91.Q

(13) A3

5(51) C 07 K 7/00

(22) 02.04.91

(32) 09.04.90, 01.09.90

(31) 90/93656, 90/231913

(33) JP, JP

(40) 15.01.92

(71) Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha, Tokyo, JP

(72) Eigozo Murayama, Shizuoka-ken, JP
Hoshi Tohru, Kanagawa-ken, JP

(54) Hybridní kalcitonin

(57) Zlepšený hybridní kalcitonin obsahuje peptidový segment lidského kalcitoninu a peptidový segment kalcitoninu živočišného původu jiného než lidského, jako lososího, úhořího nebo kuřecího. Každý z lidského nebo analogů lidského kalcitoninu a kalcitoniny živočišného původu jiného než lidského mohou být přirozeným kalcitoninem nebo jeho analogem. Hybridní kalcitonin vykazuje biologické aktivity tak silné jako lososí, úhoří nebo kuřecí kalcitonin, zatímco nepůsobí žádné vedlejší účinky zahrnující zvracení, poruchy funkcí zažívacího traktu nebo antigenicitu.

Pril.	UŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY	025340 22. V. 91
-------	----------------------------------	---------------------

Hybridní kalcitonin

Oblast techniky

Předložený vynález se týká nových analogů kalcitoninu, majících biologickou účinnost.

Dosavadní stav techniky

U kalcitoninu je znám jeho přirozený výskyt v úhořích, lososech, kuřatech, u hovězího, vepřového, skopového dobytka, u krys a u lidí. Ze kteréhokoliv zdroje je přirozeně se vyskytující kalcitonin složen ze 32 aminokyselin. Například lidský kalcitonin má následující peptidovou strukturu:

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

Úhoří kalcitonin má následující peptidovou strukturu:

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

Kalcitonin, přirozeně se vyskytující u lidí a zvířat je dále společně označován jako "přirozený kalcitonin".

Japonské zveřejněné popisy patentů č. 277698/1988, 284198/1988, 287800/1988, J.Biochem.Vol.159, str.125 (1986), Endocrinology, sv.117, str.80 (1987) a J.Biochem., sv.162, str.399 (1987) uvádějí analogy přirozených kalcitoninů. Analogy přirozených kalcitoninů zahrnují: analogy, mající alespoň jeden z aminokyselinových zbytků přirozeného kalcitoninu nahrazen jiným aminokyselinovým zbytkem (substituční typ); analogy, mající nejméně jeden z aminokyselinových zbytků přirozeného kalcitoninu (typ s vynecháním); analogy, mající nejméně jeden aminokyselinový zbytek navíc mezi aminokyselinovými zbytky nebo na konci přirozeného kalcitoninu (adiční typ); a analogy, mající dvě nebo více substitucí, vynechání a adicí kombinovaných vzájemně. Jestliže dva nebo více aminokyselinových zbytků je nahrazeno, vynecháno nebo přidáno, mohou tyto zbytky na sebe navazovat nebo mohou být umístěny tak, že jsou od sebe odděleny v peptidové struktuře. Tyto typy nepřirozených kalcitoninů jsou dále označovány jako "analogy kalcitoninu".

Přirozený lidský kalcitonin, vyskytující se přirozeně u lidí, však vykazuje nízkou biologickou účinnost pro člověka. Na druhé straně, přirozené kalcitoniny živočišného původu jiné než lidský, jako lososí, úhoří a kuřecí kalcitonin, mají vysoké biologické účinnosti pro člověka a jsou pokládány za nadějná terapeutika pro léčení osteoporózy, neoplastické hyperkalcemie a Pagetovy choroby. Mimo to byly již pro terapeutické účely vyrobeny obchodně dostup-

né úhoří kalcitoninové analogy. Bohužel přirozené kalcitoniny živočišného původu jiného než lidského a jejich analogy mají u lidí nežádoucí účinky jako je těžká nevolnost, poruchy funkcí trávicí soustavy a antigenicita.

Nevolnost způsobená přirozenými kalcitoniny živočišného původu jiného než lidského a jejich analogy je popsána v následujících publikacích:

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

Poruchy funkcí trávicí soustavy, vyvolané přirozenými kalcitoniny živočišného původu jiného než lidského a jejich analogy, jsou popsány v následujících publikacích:

- 1) K.Jonderko, Gut (England), 30, 430-435 (1989),
- 2) K.Jonderko a spol., J.Clin.Gastroenterol., 12,22-28 (1990) a
- 3) J.Hotz a spol., Digestion, 20, 180-189 (1980).

Antigenicita přirozených kalcitoninů živočišného původu jiného než lidského a jejich analogů, je popsána v následujících publikacích:

- 1) F.R.Singer a spol., J.Clinical Invest., 51, 2331-2338 (1978),
- 2) J.G.Haddad a spol., J.Clinical Invest., 51, 3133-3141 (1972) a
- 3) A.Grauer a spol., J.Bone and Mineral Res., 5, 387-391 (1990).

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je poskytnutí nových analogů kalcitoninu, které dosud v oboru nebyly známy. Stručně řečeno, tento vynález poskytuje kalcitonin, který má biologické účinky u lidí a který má u lidí jen malé vedlejší účinky. Tento kalcitonin podle vynálezu je hybridem lidského kalcitoninu a kalcitoninu živočišného původu jiného než lidského, tedy hybridní kalcitonin složený z peptidového segmentu lidského kalcitoninu a peptidového segmentu živočišného kalcitoninu jiného původu než lidského.

Autoři předloženého vynálezu zjistili, že působnost vedlejších účinků vyvolaných u lidí kalcitoninem živočišného původu jiného než lidského je lokalizována především na aminokonec, zejména v peptidovém segmentu, obsahujícím 1--16 koncových aminokyselinových zbytků. Také bylo zjištěno, že i když všech těchto 16 koncových aminokyselinových zbytků lze nahradit, nežádoucí účinky lze eliminovat náhradou nejméně 10 těchto aminokyselinových zbytků.

Pro hlavní biologické účinky kalcitoninu lidského původu a živočišného původu jiného než lidského, je důležitý sled aminokyselin na koncové karboxylové skupině, jak je popsáno v následující literatuře:

- 1) René Maier a spol., FEBS Letters, 48, 68 (1974),
- 2) René Maier a spol., Clinical Endocrinology, 5, 3275 (1976),
- 3) R.M. Epanč a spol., Eur.J.Brochom., 159, 125 (1986)
- a
- 4) D.M.Findlay a spol., Endocrinology, 117, 399 (1987).

Autoři vynálezu zjistili, že peptidový segment specifikovaný výše, tedy peptidový segment na koncové karboxylové kyselině, mající hlavní biologickou účinnost, nemá

žádná aktivní místa, která by mohla vyvolávat nežádoucí účinky u lidí a vyvinuli hybrid kalcitoninu založený na tomto poznatku. Proto z hlediska snížení nežádoucích účinků, peptidový segment, obsahující aminokyselinové zbytky v 11. a dalších polohách směrem k terminální karboxylové kyselině, může tvořit buď lidský kalcitonin nebo kalcitonin živočišného původu jiného než lidského.

Na druhé straně, z hlediska biologické účinnosti je však výhodný kalcitonin, mající vyšší biologickou účinnost než lidský kalcitonin. Proto peptidový segment bližší karboxylovému konci je výhodně segment živočišného původu jiného než lidského, který má vyšší biologickou účinnost u lidí než lidský kalcitonin. Z tohoto hlediska, peptidový segment, o který se jedná, má nejméně 4 aminokyselinové zbytky a výhodně nejméně 10 aminokyselinových zbytků.

Z hlediska výše popsaného, je hybrid kalcitoninu podle předloženého vynálezu složen ze dvou peptidových segmentů, kde jeden obsahuje 1. až 10. aminokyselinový zbytek od aminokonce a tento segment je kalcitoninovým segmentem lidského původu a druhý obsahuje 29. až 32. aminokyselinový zbytek směrem ke karboxylovému konci a tento segment je kalcitoninovým segmentem živočišného původu jiného než lidského, se středním peptidovým segmentem, obsahujícím 11. až 28. aminokyselinový zbytek, mající sled aminokyselin jakéhokoli typu kalcitoninu. Je-li to žádoucí, může přechod sledu aminokyselin lidského kalcitoninu na sekvenci nehumánního typu kalcitoninu být proveden v jakékoliv poloze peptidového segmentu mezi 11. a 28. aminokyselinovým zbytkem.

K dosažení dalšího snížení nežádoucích účinků je peptidový segment na terminálním aminokonci výhodně složen z 1. až 13. aminokyselinového zbytku lidského kalcitoninu. K dosažení dalšího zvýšení biologické účinnosti je peptidový segment ve 22. až 32. poloze výhodně tvořen peptidovým segmentem živočišného původu jiného než lidského. Peptidový segment ve 14. až 21. poloze terminálního aminokonce může mít aminokyselinovou sekvenci jakéhokoliv typu kalcitoninu a může tvořit přechod sêkvence aminokyselin lidského kalcitoninu na nehumánní kalcitonin v jakékoliv poloze tohoto přechodového segmentu. V nejvýhodnějším provedení je hybridní kalcitonin podle předloženého vynálezu složen z peptidového segmentu humánního kalcitoninu v poloze 1. až 16. terminálního aminokonce a z peptidového segmentu nehumánního kalcitoninu v poloze 17. až 32..

Stručný popis obrázků

Na obr. 1 je graf znázorňující časovou závislost hladiny vápníku v krevní plasmě po podání různých typů kalcitoninů,

na obr. 2 je graf, znázorňující časovou závislost hodnot prahové stimulace, získaných po podání různých typů kalcitoninů,

na obr. 3 je graf, znázorňující změny tělesné hmotnosti krysy po podání různých typů kalcitoninů,

na obr. 4 je graf, znázorňující příjem potravy krysami po podání různých typů kalcitoninů,

na obr. 5 je graf, znázorňující vztah mezi koncentrací lososího kalcitoninu a vazbou protilátky a

na obr. 6 - 9 jsou grafy, znázorňující účinnost vazby lososího kalcitoninu a dvou hybridních kalcitoninů na anti-lososí kalcitonin lidského séra.

Výraz "humánní (lidský) kalcitonin" v tomto popise znamená jak přirozený lidský kalcitonin tak přirozeně se nevyskytující analogy lidského kalcitoninu. Obdobně výraz "nehumánní kalcitonin" nebo kalcitonin živočišného původu jiného než lidského, znamená jak přirozeně se vyskytující kalcitonin živočišného původu jiného než lidského, tak přirozeně se nevyskytující analogy tohoto nehumánního kalcitoninu. Živočichové jiní než člověk jsou výhodně losos, úhoř a kuře, výběr však není na ně omezen. Počet vyměněných, vynechaných nebo přidanych aminokyselinových zbytků u obou typů kalcitoninových analogů není omezen na nějakou určitou hodnotu, ale výhodně není větší než 5. Jestliže peptidový segment, o který se jedná, neobsahuje více než 5 aminokyselinových zbytků, pak počet vyměněných, vynechaných nebo přidanych aminokyselinových zbytků, není výhodně větší než jeden a jestliže tento peptidový segment neobsahuje více než 10 aminokyselinových zbytků, tak odpovídající počet vyměněných, vynechaných nebo přidanych aminokyselinových zbytků není větší než 3.

V případě peptidového segmentu humánního kalcitoninu je výhodně sekvence aminokyselinových zbytků od terminálního aminokonce stejná jako u přirozeného humánního kalcitoninu nebo tento segment může tvořit peptidový segment analogu humánního kalcitoninu, majícího stejnou sekvenci aminokyselin jako přirozený humánní kalcitonin s tou výjimkou, že methioninový zbytek v poloze 8 je nahrazen valinovým zbytkem. Pokud jde o celý peptidový segment humánního kalcitoninu, je výhodný takový analog, kde ne více než dva aminokyselinové zbytky v humánním kalcitoninu jsou nahrazeny, vynechány nebo přidány. Nejvýhodnější analog je takový peptidový segment, který jako celek se liší od přirozeného typu pouze substitucí methioninového zbytku v poloze 8.

V případě peptidového segmentu kalcitoninu živočišného původu jiného než lidského, je výhodně tento peptidový segment stejný jako přirozený kalcitonin, nebo jím může být peptidový segment nehumánního kalcitoninového analogu, kde ne více než 3 aminokyselinové zbytky přirozeného typu jsou nahrazeny, vynechány nebo přidány. Ještě výhodnější analog je takový peptidový segment, který jako celek má takovou sekvenci jako přirozený typ, kde pouze jeden aminokyselinový zbytek je nahrazen nebo vynechán.

Výhodnými živočichy odlišnými od člověka jsou ti, jejichž kalcitonin má pro člověka vyšší biologické účinky. Příklady těchto živočichů zahrnují ryby, jako je losos nebo úhoř, a ptáky jako je kuře. Losos a úhoř je ještě výhodnější, přičemž je zvláště výhodný losos.

Při zvážení těchto skutečností, má hybridní kalcitonin podle předloženého vynálezu následující aminokyselinovou sekvenci:

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

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

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

Thr-Asn(nebo Asp)-Thr(nebo Val)-Gly-Ser(nebo Ala)-Gly-Thr-
25 26 27 28 29 30 31 32

Pro-NH₂

V hybridním kalcitoninu podle předloženého vynálezu je ta část struktury celého kalcitoninu živočišného původu jiného než lidského, jako lososího, úhořího nebo kuřecího, která při podání člověku vyvolává nežádoucí účinky (například nevolnost, poruchy funkcí trávicího traktu a antigenicitu) nahrazena odpovídajícím segmentem humánního kalcitoninu, nevyvolávajícím tyto nežádoucí účinky, čímž nežádoucí účinky, vyvolávané částí nehumánního kalcitoninu jsou snížena nebo zcela eliminovány. Ekvivalentně lze říci, že hybridní kalcitonin podle vynálezu má farmakologicky aktivní místa humánního kalcitoninu nahrazena odpovídajícím segmentem nehumánního kalcitoninu tak, aby se zvýšila žádoucí fyziologická účinnost humánního kalcitoninu.

Hybridní kalcitonin podle vynálezu lze syntetizovat syntézami v pevné fázi za použití polymerních pryskyřic nebo syntézami v kapalně fázi, obecně používanými v oblasti organických syntéz. Použití syntéz v pevné fázi je výhodné v případě syntézy poměrně malého množství peptidu. Naopak použití syntéz v kapalně fázi je výhodné při syntéze velkého množství peptidu. V příkladech dále uvedených v tomto popise byly peptidy syntetizovány syntézami v pevné fázi. Nicméně jestliže hybridní kalcitonin podle vynálezu má být vyroben ve velkém množství, je výhodné použití syntéz v kapalně fázi, které jsou velmi dobře známy v oboru syntézy peptidů.

Obvyklý postup syntéz v kapalně fázi začíná syntetizováním nejméně dvou dílčích peptidů, z nichž každý je složen ze dvou nebo více aminokyselinových zbytků, postupným spojením těchto dílčích peptidů se závěrečným získáním požadovaného peptidu, majícího výše specifikovanou aminokyselinovou sekvenci (pro případ tohoto vynálezu je tímto požadovaným peptidem hybridní kalcitonin, jak je popsá-

no výše). Syntéza v kapalně fázi je dále charakterizována provedením reakce peptidové syntézy v kapalném mediu, zvláště v takovém mediu jako je dimethylformamid nebo tetrahydrofuran. Dílčí peptid je obvykle složen ze 2 až 20, výhodně 3-15 aminokyselinových zbytků. Ve výhodném provedení se syntetizuje asi 2 až 20 těchto dílčích peptidů, které se pak postupně spojují dokončením syntézy požadovaného peptidu.

V peptidové syntéze popsané výše se jako výchozí látky obvykle použijí reaktivní deriváty aminokyselin. Jestliže výchozí aminokyselina obsahuje aktivní funkční skupiny jiné než skupiny, tvořící peptidové vazby, je výhodné tyto aktivní funkční skupiny chránit chránícími skupinami, které se odstraní po ukončení syntézy peptidu. Peptid, který má být vyroben podle vynálezu má disulfidickou vazbu v poloze 1-7, kterou lze vytvořit v jakémkoliv vhodném stupni následujícím po syntéze dílčího peptidu, majícího sekvenci 1-7. Nicméně tato disulfidická vazba má nízkou stabilitu a je výhodné ji vytvořit až po ukončení peptidové syntézy. Tyto podmínky pro chránění skupin, odstraňování chránících skupin a tvorbu disulfidické vazby je také výhodné přijmout pro syntézy v pevné fázi, které jsou dále popsány.

Syntézy v pevné fázi představují postup syntetizování peptidu, majícího požadovanou aminokyselinovou sekvenci, postupnou vyzbou aminokyselinových zbytků na pryskyřicový nosič. Tento postup lze provést automaticky za použití automatického syntetizátoru.

Pryskyřice, které lze použít při syntézách v pevné fázi, zahrnují chlormethylové pryskyřice, oxymethylové pryskyřice, 4-(oxymethyl)fenylacetamidomethylové pryskyřice, benzhydrylaminové pryskyřice a polyakrylamidové pryskyřice.

Aminokyseliny použité při těchto syntézách jsou, jak je vyžadováno, chráněnými aminokyselinami. Příklady α -aminochránících skupin zahrnují karbobenzoxyskupinu (Z), terciární butyloxykarbonylovou skupinu (Boc), 9-fluorenylmethyloxycarbonylskupinu (Fmoc), formylovou skupinu (HOC) a acetylovou skupinu (Ac). Příklady α -karboxylových chránících skupin zahrnují benzylovou skupinu (Bzl), terc.butylovou skupinu (Bu^t), methylovou skupinu (Me), ethylovou skupinu (Et) a fenacylovou skupinu (Pac). Skupiny, které mohou být použity pro chránění funkčních skupin v aminokyselinových řetězcích zahrnují: benzylovou skupinu (Bzl), p-toluensulfonylovou skupinu (Tos), p-nitrofenolovou skupinu (NO_2), benzhydrylovou skupinu (Bzh), acetamidomethylovou skupinu (Acm), terc.butylovou skupinu (Bu^t), terc.butyloxykarbonylovou skupinu (Boc), cyklohexylovou skupinu (CHex) a 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzensulfonylovou skupinu (Mtr). Může být použita jedna nebo více takových chránících skupin v závislosti na účelu, kterého má být dosaženo.

Sekvenční adiční reakci aminokyselin lze provést dehydratační kondenzací za použití karbodiimidů nebo pomocí aktivních esterů. Vhodné karbodiimidy zahrnují dicyklohexylkarbodiimidy a 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid a vhodné aktivní estery zahrnují N-hydroxysukcinimid ester (-OSu), pentafluorfenolester (-OPfp) a dihydroxobenztriazinester (-ODhbt).

Katalyzátory reakce, které lze použít zahrnují:

DMF, THF, dichlormethan, chloroform, ethylacetát, dioxan, DMSO, N-methylpyrrolidin, pyridin a vodu.

K odstranění chránících skupin lze použít různá činidla v závislosti na druhu chránící skupiny, která má být odstraněna a účelu, kterého má být dosaženo, příklady vhodných činidel zahrnují: fluorovodík, kyselinu trifluoroctovou, trifluormethansulfonovou kyselinu, amoniak/methanol, bromovodík/kyselinu octovou, vodík/palladium na uhlí, octan

rtuťnatý, kyselinu octovou/práškový zinek, a alkalii/vodu-methanol.

Během syntézy nebo po ní lze použít různých čistících postupů jako je chromatografie s reverzními fázemi, chromatografie s normálními fázemi, chromatografie na ionto-měnících, gelová filtrační chromatografie a rekrystali-zace. Disulfidické vazby lze vytvořit oxidací atmosféric-kým vzduchem nebo kyanidem železitým.

Následující příklady jsou uvedeny pro další ilustra-ci tohoto vynálezu, ale žádným způsobem jej neomezuji.

Příklady 1-6 představují syntézy vzorků hybridního kalcitoninu podle vynálezu, příklad 7 uvádí výsledky ana-lýzy složení aminokyselin u vzorků kalcitoninu vyrobených v příkladech 1-6. Příklady 8-10 uvádějí pokusy provedené k hodnocení hlavních účinností hybridního kalcitoninu podle vynálezu. Příklady 11-14 popisují pokusy provedené k prokázání eliminace vedlejších účinků kalcitoninu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Syntéza (1-16)lidského/(17-32)lososího hybridního kalcito-ninu

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-NH₂

31 32

Syntéza byla provedena reakcí v pevné fázi za použití automatického syntetizátoru.

(I) Zavedení prolinu na benzhydrylaminovou (BHA) pryskyřici

Deset gramů BHA pryskyřice ($-NH_2$: 0,38 mmol/g) bylo suspendováno a ponecháno nabotnat ve 100 ml DMF. Po odstranění supernatantu bylo přidáno dalších 100 ml DMF a pak následoval přídavek BocProOH (15 mmol), DCC (20 mmol) a HOBt (20 mmol). Směs byla třepána přes noc při teplotě místnosti. Po filtraci přes skleněný filtr byla výsledná pryskyřice promyta methylenchloridem.

Potom bylo přidáno 200 ml methylenchloridového roztoku, který obsahoval 10 % obj./obj. anhydridu kyseliny octové a směs byla třepána 1 hodinu při teplotě místnosti k zablokování zbývajících aminoskupin. Po ukončení reakce byla pryskyřice promyta methylenchloridem a vysušena pod vakuem.

Po vysušení bylo přidáno 50 ml methylenchloridového roztoku, obsahujícího 50 % obj./obj. kyseliny trifluoroctové a směs byla míchána 1 hodinu při teplotě místnosti. Po filtraci skleněným filtrem byla takto zpracovaná pryskyřice postupně promyta methylenchloridem, methanolem a triethylaminem a vysušena pod vakuem.

(2) Sekvenční adiční reakce aminokyselin

Jeden gram pryskyřice získané postupem uvedeným v bodě 1 byl vpraven do kolony automatického syntetizátoru a aminokyseliny byly sekvenčně adovány za následujících podmínek:

- i) reakce: 30 min při teplotě místnosti v DMF jako rozpouštědle

- ii) promývání: 10 min při teplotě místnosti v DMF
- iii) odstranění Fmoc: 10 min při teplotě místnosti s 20 %
obj./obj. piperidinu v DMF jako rozpouštědlo
- iv) promývání: 10 min při teplotě místnosti v DMF

Opakováním stupňů (1) - (4) bylo po Pro přidáno
31 aminokyselin. Použité aminokyseliny jsou uvedeny v tabul-
ce 1 uvedené dále.

Tabulka 1

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(Obut)-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

Po ukončení reakce byly chránicí skupiny a pryskyřice z peptidu odstraněny fluorovodíkem a peptid byl promyt etherem. Sraženina byla rozpuštěna v 50 % obj./obj. vodném roztoku kyseliny octové a nerozpustný podíl byl odfiltrován. Filtrát byl lyofilizován za tvorby asi 600 mg surového peptidu.

(3) Čištění a tvorba disulfidových vazeb.

Podíl (asi 500 mg) surového peptidu byl rozpuštěn ve vodě, obsahující 0,1 % obj./obj. TFA a roztok byl zpracován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na koloně ODS.

Eluce kolony byla provedena použitím roztoku A (acetonitril, obsahující 0,1 % obj./obj. TFA) a roztoku B (voda obsahující 0,1 % obj./obj. TFA) při postupném gradientu (A/B v % obj./obj.) zvyšovaném od 20 přes 30 až 40 %, kdy frakce při 30% eluční fázi byly izolovány a lyofilizovány.

Lyofilizovaný peptid (46 mg) byl rozpuštěn v 50 ml 0,05 % obj./obj. roztoku kyseliny octové a pH roztoku bylo upraveno na 8,5 3M vodným roztokem amoniaku. Potom bylo přidáno 1,5 ml 0,1M roztoku $K_3Fe(CN)_6$ a směs byla míchána po dobu 30 minut při teplotě místnosti ke tvorbě disulfidových vazeb. Po úpravě pH na hodnotu 5,0 pomocí 50% kyseliny octové byla přidána anexová pryskyřice (v Cl^- formě), směs byla míchána po dobu 20 minut a pak byla pryskyřice odfiltrována.

Filtrát byl zahuštěn a přečištěn vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na koloně ODS znovu stejným výše popsaným způsobem. Frakce z 30% eluční fáze byly shromážděny a lyofilizovány za získání 28 mg požadovaného peptidu.

Příklad 2

Syntéza (1-16)lidského/(17-32)úhořího hybridního kalcitoninu:

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-NH ₂	
-------------------------	--

31	32
----	----

(1) Sekvenční adiční reakce aminokyselin

Jeden gram BHA pryskyřice se zavedeným prolinem, připravené podle stupně (1) příkladu 1 byl naplněn do kolony automatického syntetizátoru a aminokyseliny byly přidávány za stejných podmínek reakce, jaké byly použity ve stupni (2) příkladu 1. Použité aminokyseliny jsou uvedeny v tabulce 2 dále.

Tabulka 2

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(OBut)-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(OBut)-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

Po ukončení reakce byla pryskyřice s obsaženým peptidem zpracována stejným způsobem jak je uvedeno ve stupni (2) příkladu 1 za získání asi 510 mg surového produktu-peptidu.

(2) Čištění a tvorba disulfidových vazeb

Podíl surového peptidu (asi 450 mg) byl podroben přečištění a tvorbě disulfidových vazeb za použití stejných postupů, které byly použity ve stupni (3) příkladu 1 za získání 32 mg přečištěného produktu - peptidu.

Příklad 3

Syntéza (1-16, Met⁸ → Val⁸) lidského analogu/(17-32) úhořího hybridního kalcitoninu

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) Sekvenční adiční reakce aminokyselin

Jeden gram BHA pryskyřice se zavedeným prolinem, připravené podle stupně (1) příkladu 1 byl naplněn do kolony automatického syntetizátoru a aminokyseliny byly přidávány za stejných podmínek reakce, jaké byly použity ve stupni (2) příkladu 1. Použité aminokyseliny jsou uvedeny v tabulce 3 dále.

Tabulka 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(OBut)-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(Obut)-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

Po ukončení reakce byly pryskyřice s navázaným peptidem zpracovány stejným způsobem jak je uvedeno ve stupni (2) příkladu 1 za získání asi 580 mg surového peptidu.

(2) Čištění a tvorba disulfidových vazeb

Podíl surového peptidu (asi 500 mg) byl podroben přečištění a tvorbě disulfidových vazeb za použití stejných postupů, které byly použity ve stupni (3) příkladu 1 a bylo získáno 35 mg přečištěného peptidu.

Příklad 4

Syntéza (1-16) lidského / (17-31, Des Leu¹⁹) analogu úhořího hybridního kalcitoninu

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

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Pro-NH₂

31

(1) Sekvenční adiční reakce aminokyselin

Jeden gram BHA pryskyřice se zavedeným prolinem, připravené podle stupně (1) příkladu 1, bylo naplněno do kolony automatického syntetizátoru a aminokyseliny byly přidávány za stejných podmínek reakce, jaké byly použity ve stupni (2) příkladu 1. Použité aminokyseliny jsou uvedeny dále v tabulce 4.

Tabulka 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(OBut)-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(OBut)-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

Po ukončení reakce byla pryskyřice s obsaženým peptidem zpracována stejným způsobem jak je uvedeno ve stupni (2) příkladu 1 za získání asi 520 mg surového peptidu.

(2) Čištění a tvorba disulfidových vazeb

Podíl surového peptidu (asi 450 mg) byl podroben přečištění a tvorbě disulfidových vazeb za použití stejných postupů, které byly použity ve stupni (3) příkladu 1 a bylo získáno 23 mg přečištěného peptidu.

Příklad 5

Syntéza (1-13) lidského/(14-32) lososího hybridního kal-citoninu

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

Syntéza byla provedena reakcí v pevné fázi při použití automatického syntetizátoru.

(1) Zavedení prolinu na benzhydrylaminovou (BHA) pryskyřici

Deset gramů BHA pryskyřice ($-NH_2$: 0,38 mmol/g) bylo suspendováno a ponecháno nabobtnat ve 100 ml DMF. Po odstranění supernatantu bylo přidáno dalších 100 ml DMF a pak následoval přidavek BocProOH (19 mmol), DCC (10 mmol) a HOBT (19 mmol). Směs byla třepána přes noc při teplotě místnosti. Po filtraci přes skleněný filtr byla výsledná

pryskyřice promyta methylenchloridem. Potom bylo přidáno 200 ml methylenchloridového roztoku, obsahujícího 10 % obj./obj. anhydridu kyseliny octové a směs byla míchána 1 hodinu při teplotě místnosti k zablokování zbývajících aminoskupin. Po zakončení reakce byla směs promyta methylenchloridem a vysušena za vakua.

Po vysušení bylo přidáno 50 ml methylenchloridového roztoku, obsahujícího 50 % obj./obj. kyseliny trifluoroctové a tato směs byla míchána 1 hodinu při teplotě místnosti. Po filtraci skleněným filtrem byla takto zpracovaná pryskyřice postupně promyta methylenchloridem, methanolem, methylenchloridem a triethylaminem a vysušena pod vakuem.

Vzorek výsledné směsi pryskyřice byl analyzován na analyzátoru aminokyselin a bylo zjištěno, že do jednoho gramu pryskyřice bylo včleněno 0,31 mmol prolínu.

(2) Sekvenční adiční reakce aminokyselin

Jeden gram pryskyřice získané postupem uvedeným ve stupni (1) byl vpraven do kolony automatického syntetizátoru a aminokyseliny byly postupně přidávány za následujících podmínek:

- (i) adiční reakce: 30 min při teplotě místnosti v DMF jako rozpouštědle
- (ii) promývání: 10 min při teplotě místnosti s DMF
- (iii) odstranění Fmoc: 10 min při teplotě místnosti s 20 obj./obj.% piperidinu v DMF jako rozpouštědle
- (iv) promývání: 10 min při teplotě místnosti s DMF

Opakováním stupňů (1)-(4) bylo po Pro přidáno 31 aminokyselin. Použité aminokyseliny jsou uvedeny v tabulce 5 dále.

Tabulka 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

Po ukončení reakce byly chránicí skupiny a pryskyřice z peptidu odstraněny fluorovodíkem a peptid byl promyt etherem. Sraženina byla rozpuštěna ve vodném 50% obj./obj. roztoku kyseliny octové a nerozpustný podíl byl odfiltrován. Filtrát byl lyofilizován za získání asi 720 mg surového peptidu.

(3) Čištění a tvorba disulfidových vazeb

Podíl (asi 700 mg) surového peptidu byl rozpuštěn ve vodě, obsahující 0,1 % obj./obj. TFA a roztok byl zpracován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na koloně ODS.

Eluce kolony byla provedena za použití mobilní fáze, obsahující vodu a acetonitril, obsahující 0,1 % TFA s postupným gradientem acetonitrilu, zvyšujícím se od 20 % obj./obj. přes 30 % obj./obj. až na 40 % obj./obj., kdy frakce při použití 30 % obj./obj. eluční fáze byly izolovány a lyofilizovány (primární přečištění).

Lyofilizovaný peptid (asi 80 mg) byl rozpuštěn v 80 ml 0,05 % obj./obj. roztoku kyseliny octové a pH roztoku bylo upraveno na 8,5 3M vodným roztokem amoniaku. Potom bylo přidáno 1,5 ml 0,1M roztoku $K_3Fe(CN)_6$ a směs byla míchána po dobu 30 minut při teplotě místnosti ke tvorbě disulfidových vazeb. Po úpravě pH na hodnotu 5,0 pomocí 50 % obj./obj. kyseliny octové byla přidána anexová pryskyřice (v Cl^- formě), směs byla míchána po dobu 20 min a pak byla pryskyřice odfiltrována.

Filtrát byl zahuštěn a opět zpracován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na koloně ODS, přičemž eluce kolony byla provedena stejnou mobilní fází jako při primárním přečištění při postupném gradientu acetonitrilu od 25, 27 přes 30 až 35 % obj./obj. (sekundární přečištění).

Frakce získané při eluční fázi 30 % obj./obj. byly shromážděny a lyofilizovány za získání 53 mg uvedeného peptidu.

Příklad 6

Syntéza (1-21)lidského/(22-32)lososího hybridního kalci-toninu

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

Jeden gram BHA pryskyřice se zavedeným prolinem podle stupně (1) příkladu 5 byl naplněn do kolony automatického syntetizátoru a byly přidávány aminokyseliny za stejných podmínek reakce, jaké byly použity ve stupni (2) příkladu 5. Použité aminokyseliny jsou uvedeny v tabulce 6 dále.

Tabulka 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(Obut)-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

Po ukončení reakce byla pryskyřice s obsaženým peptidem zpracována stejným způsobem jak je uvedeno ve stupni (2) příkladu 5 za získání asi 860 mg surového peptidu.

(2) Čištění a tvorba disulfidových vazeb

Podíl surového peptidu (asi 850 mg) byl podroben přečištění a tvorbě disulfidových vazeb za použití stejných postupů, které byly použity ve stupni (3) příkladu 5.

Výsledný filtrát byl zahuštěn a opět zpracován vysokou účinnou kapalinovou chromatografií na koloně ODS, přičemž eluce kolony byla provedena stejnou mobilní fází jako při primárním přečištění při postupném gradientu acetonitrilu od 24 do 35 % obj./obj. přes 26, 28 a 30 % obj./obj. (sekundární čištění). Frakce získané při eluční fázi 28 % obj./obj. byly shromážděny a lyofilizovány za získání 66 mg požadovaného peptidu.

Příklad 7

Analýza složení aminokyselin

Všechny přečištěné hybridní kalcitoniny připravené v příkladech 1-6 byly hydrolyzovány při 150 °C po dobu 1 h v prostředí 6N HCl a složení aminokyselin bylo stanoveno pomocí analyzátoru aminokyselin. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7

Aminokyseliny	Příklad 1	příklad 2	příklad 3	příklad 4	příklad 5	příklad 6
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)

Poznámka: teoretické hodnoty jsou uvedeny v závorkách

Příklad 8

Stanovení biologické účinnosti

Šest nových kalcitoninů připravených v příkladech 1-6 bylo rozpuštěno v 0,1M pufru octanu sodného (pH 4,2), který obsahoval 0,1 % BSA (hovězí serový albumin) a injekčně podány SD krysím samcům (4 týdny starým) podrobeným hladovění (24 h) do ocasní žíly. Po jedné hodině byla stanovena koncentrace sérového kalcia metodou OCPC (Calcium C - Test Wako of Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

Účinnost kalcitoninu, která způsobila 10% snížení koncentrace sérového kalcia byla zvolena jako 10 mJ a počet jednotek v jednom miligramu kalcitoninu byl označen jako "specifická účinnost". Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8

Nový kalcitonin	specifická aktivita (J/mg)
příklad 1	2106 ^x
2	2639
3	2262
4	2611
5	2575
6	1792

^xPrůměr ze dvou měření

Příklad 9

Účinnost kalcitoninů vůči hyperkalcemii

Postup:

5 týdnů starým SD krysám samcům byl 4 dny po sobě orálně podáván vitamin D₃ (5 mg/kg) tak, aby se vytvořil experimentální model hyperkalcemických krys. Pátý den byl subkutánní injekcí podán (1-16) lidský/(17-31) lososí hybridní kalcitonin (hybridní kalcitonin 1), lososí kalcitonin a lidský kalcitonin, každý v množství 4 IU/kg. V daných časových intervalech byly odebírány vzorky krve a byla stanovena koncentrace kalcia v plasmě.

Výsledky a diskuse:

Časové závislosti hladin kalcia v plasmě pro zkoušené kalcitoniny jsou znázorněny na obr. 1. Jak je zřejmé z obr.1 všechny testované kalcitoniny, tj. hybrid kalcitoninu 1, lososí kalcitonin a lidský kalcitonin vyvolaly rychlé snížení zvýšené hladiny krevního kalcia. Je proto zřejmé, že hybridní kalcitonin podle vynálezu je stejně účinný vůči hyperkalcemii jako lososí kalcitonin a lidský kalcitonin.

Příklad 10

Analgetický účinek kalcitoninů

i) zvířata

Bylo použito deset králičích samců (Kbl:JW) o hmotnosti 2,7-3,2 kg.

ii) Implantace zavaděcí kanyly pro intraventrikulární podání

Králíci byli fixováni ve stereotaxickém zařízení pod

pentobarbitalovou anestezií (30 mg/kg i.v.). Po naříznutí kůže byla vodící kanyla pro intraventrikulární podání zavedena u každého zvířete do levého laterálního ventrikulu a fixována dentálním cementem (stereotaxické souřadnice od bregma: posteriorně 4,0 mm, laterálně 5,5 mm, ventrálně 5,5 mm). Po jednotýdenní rekonvalescenci byli králíci podrobeni pokusu popsanému níže. Po pokusu byla injektována methylenová modř k ověření umístění kanyly.

iii) Zkouška antinocicepce

Králíci byli fixováni v kleci a do obou laterálních stran horního hlavního řezáku byly vyvrtány díry o průměru 1 mm a do hloubky 1 mm pomocí zubolékařské vrtačky. Do každé díry byla upevněna stimulační elektroda a byla

aplikována elektrická stimulace (5 ms, 5 Hz, doba aplikace 3 s) při různých napětích pomocí elektrického stimulatoru (Nihon Kohden Corp.) ke stanovení stimulačních hodnot (V), vyvolávajících u pokusných zvířat olizování (olizování a pohyb pysků, snižování čelistí).

Měření byla prováděna jednu hodinu před podáním léčiva, bezprostředně po podání léčiva, rovněž jako 0,5 h, 1,0 h, 1,5 h, 2,0 h, 3,0 h a 4,0 h po podání léčiva.

Testovanými léčivy byl (1-16) lidský/(17-32) lososí hybridní kalcitonin (hybridní kalcitonin 1), lososí kalcitonin a lidský kalcitonin, z nichž každý byl podán intraventrikulárně v množství ekvivalentním 8 IU/kg. V kontrolním pokuse byl použit fyziologický solný roztok.

Výsledky a diskuse:

Časové závislosti stimulace prahových hodnot pro testované kalcitoniny jsou uvedeny na obr. 2. Jak lze vidět z obr. 2, uvedené tři kalcitoniny vyvolaly srovná-

telné zvýšení prahových hodnot, které dosáhly maxima 0,5 - 1,5 h po jejich podání. Lze proto usuzovat, že hybridní kalcitonin podle vynálezu má stejnou analgetickou účinnost jako lososí a lidský kalcitonin.

Příklad 11

Účinky kalcitoninů na inhibici hmotnostního přírůstku a apetitu

Postup:

Krysám byl intramuskulární injekcí podán (1-16) lidský/ (17-32) lososí hybridní kalcitonin (hybridní kalcitonin 1), lidský kalcitonin a úhoří kalcitonin a po 24 h byla stanovena jejich tělesná hmotnost a spotřeba krmiva.

Výsledky:

Změny tělesné hmotnosti krys po podání různých kalcitoninů jsou uvedeny na obr. 3 a změny spotřeby krmiva na obr. 4. Každý z kalcitoninů byl podán ve třech různých dávkách: 12,5 UI/kg, 50 UI/kg a 200 IU/kg. U změn tělesné hmotnosti jsou uvedené hodnoty průměrem pro 5 krys, u spotřeby krmiva se jedná o spotřebu pro 5 krys.

Diskuse:

Jak je zřejmé z obr. 3 a 4, lososí a úhoří kalcitonin vykazuje dávkově závislé účinky na inhibici hmotnostního přírůstku a apetit, zatímco hybridní kalcitonin 1 a lidský kalcitonin nevyvolávají žádné difference tělesné hmotnosti a spotřeby potravin. Lze proto konstatovat, že hybrid kalcitoninu podle vynálezu vyvolává jen tak malé účinky na tělesnou hmotnost a apetit jako lidský kalcitonin.

Příklad 12

Účinky kalcitoninů na dobu vyprázdnění žaludku

Postup:

Fenám beaglů, od předcházejícího dne hladověných, byl injekčně podán jednou venou cephalica (1-16) lidský/(17-32) lososí hybridní kalcitonin (hybridní kalcitonin¹), lososí kalcitonin, lidský kalcitonin a fyziologický solný roztok. O hodinu později byly orálně podány enterosolventní tablety aspirinu (obsahující 200 mg účinné látky) společně se 25 ml vody. Potom byly v daných časových intervalech odebrány z další veny cephalica vzorky krve a plasma získaná obvyklým způsobem byla až do rozboru vzorku uchovávána při -20 °C.

Při průchodu střevní stěnou je většina použitého aspirinu metabolizována a dostává se do krevního řečiště ve formě kyseliny salicylové. Proto byla stanovována kyselina salicylová jako marker aspirinu. K 50 μ l plasmy bylo přidáno 200 μ l ethanolu, směs byla odstřeďována 1 min při frekvenci otáčení 10000 min⁻¹ a získaný supernatant byl zpracován HPLC.

Výsledky:

Zpožďující účinky všech zkoušených kalcitoninů na dobu vyprázdnění žaludku jsou shrnuty v tabulce 9. U každého pokusného zvířete byl vypočten rozdíl mezi dobou od podání kalcitoninu k absorpci aspirinu a dobou od podání fyziologického solného roztoku k absorpci aspirinu k určení doby zpoždění vyprázdnění žaludku.

Tabulka 9

Kalcitonin	dávka	doba zpoždění			rozdíl zpoždění		
	<u>/ug(IU)/kg</u>	<u>h</u>			<u>h</u>		
hybridní							
kalcitonin	0,6 (1,2)	1,9	4,8	7,7	0,0	3,2	6,6
1	10 (21,0)	5,1	18,0	21,4	3,8	16,3	20,3
	0,1 (0,4)	2,0	2,0		0,3	0,7	
lososí	0,3 (1,2)	2,7	4,5	11,1	0,0	3,9	10,0
kalcitonin	0,6 (2,4)	22,0	30,0	45,0	19,4	29,4	43,1
lidský	6 (1,2)	3,0	3,9	4,0	1,3	2,6	2,9
kalcitonin	100 (20,0)	5,0	6,9		4,4	5,0	

Poznámka:

Doba zpoždění: doba od podání aspirinu k jeho absorpci.
 Rozdíl zpoždění: rozdíl v dobách absorpce aspirinu při
 podání kalcitoninu a fyziologického solného roz-
 toku.

Diskuse:

Jak je zřejmé z tabulky 9, lososí kalcitonin má vel-
 mi silné zpožďující účinky na dobu vyprazdňování žaludku,
 zatímco lidský kalcitonin má tyto účinky slabé. Zpožďující
 účinky na vyprazdňování žaludku hybridu kalcitoninu 1
 byly podobnější lidskému kalcitoninu než lososímu kalcito-
 ninu. Ze proto učinit závěr, že hybridní kalcitonin 1
 podle vynálezu lze podávat ve vyšších hladinách jednotek
 účinnosti než lososí kalcitonin.

Příklad 13

Účinky kalcitoninů na gastrointestinální motilitu psů
při vědomí

Postup:

Zdraví psi beagle o hmotnosti asi 10 kg byly anestetizovány i.v. injekcí pentobarbitalu sodného a za aseptických podmínek jim byla otevřena břišní dutina.

Do serozní blány antra žaludku, duodena a lačníku byly všity speciální hliníkové převodníky síly, sloužící ke sledování kruhových svalových kontrakcí způsobem dříve popsáným (Itoh a spol., Gastroenterol Jpn. 12, 275 1977).

Přívodní dráty těchto převodníků, vycházející z břišní dutiny byly vyvedeny kožním řezem mezi lopatkami.

Po této břišní operaci byl na převé přední straně krku proveden 5 cm podélný kožní řez k vystavení vnější jugulární žíly.

Touto žílou byla do horní duté žíly zavedena trubice ze Silastiku (French size 8,5, Dow corning, Midland, MI) a všita do přilehlé kůže pro i.v. injekční podání zkoušených léčiv.

Po operaci byl psovi nasazen korzetový chránič k fixaci vodících drátů a silastikové trubice.

Pes byl umístěn do individuální experimentální klece a byla mu v 17 h podávána konvenční psí strava, přičemž byla voda poskytována bez omezení.

Gastrointestinální motorická aktivita byla zaznamenávána pomocí zapisovače s termickým záznamem (WR-3101, Graphic, Tokyo, Japonsko) pro připojení vodičích drátů převodníků na připojovací kabel zesilovače (UG-5, Nihon Kohden, Tokyo, Japonsko).

Asi dva týdny po operaci mohla být gastrointestinální kontraktilní aktivita rozdělena na dva typy aktivity, interdigestivní stav a digestivní stav.

V interdigestivním stavu byly pozorovány IMC (interdigestivní migrační motorický komplex) v pravidelných intervalech 100 až 120 min v antru žaludku, migrující do duodena a lačníků konstantní rychlostí.

U všech pokusných zvířat krmení přerušovalo pravidelnost IMC. Pokusy byly provedeny v intradigestivním stavu. Léčivo bylo rozpuštěno v 0,9% solném roztoku a podáno zavedenou Silastikovou trubičkou během asi 10 sekund v dávce 0,3 ml/kg 15 minut po skončení IMC v antru žaludku s následným promytím 0,9% solným roztokem.

Byla měřena doba do dalšího výskytu IMC po podání léčiva a použita jako index inhibiční aktivity léčiva na gastrointestinální motilitu.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10

lososí	dávka, /ug/kg	0,1	0,3	1,0	3		
kalcitonin (U/kg)		(0,4)	(1,2)	(4,0)	(12)		
	IMC zpoždění	0	1	2	3		
lidský	dávka, /ug/kg	100	300	1000			
kalcitonin (U/kg)		(20)	(60)	(200)			
	IMC zpoždění	0	0,5	0,5			
hybridní	dávka, /ug/kg	0,03	0,1	1,0	3,0	100	
kalcitonin (U/kg)		(0,06)	(0,21)	(2,1)	(6,3)	(210)	
1	IMC zpoždění	0	0,5	1	1	1	
hybridní	dávka, /ug/kg	0,03	1,0	3,0	10	30	100
kalcitonin (U/kg)		(0,5)	(1,8)	(5,4)	(18)	(54)	(180)
2	IMC zpoždění	0	0,5	1	1	1	1

Poznámka:

1. Údaje "IMC-zpoždění" znamenají následující:

0... příští IMC se objevilo do 180 minut po podání

0,5... příští IMC se objevilo v době více než 180 minut po podání, ale do 300 minut po podání

1 ... příští IMC se objevilo jeden den po podání

2 ... příští IMC se objevilo dva dny po podání

3 ... příští IMC se objevilo 3 dny po podání

2. Hybridní kalcitonin 1 byl (1-16)lidský/(17-32)lososí kalcitonin a hybridní kalcitonin 2 byl (1-21)lidský/(22-32) lososí kalcitonin.

Diskuse:

Jak je uvedeno v tabulce 10, lososí kalcitonin podaný i.v. vyvolává závislou inhibici dalšího výskytu IMC u psů při vědomí.

V dávce 3 $\mu\text{g/kg}$ bylo zpoždění výskytu příští IMC 3 dny. Na druhé straně lidský kalcitonin měl pouze malý vliv na IMC.

Ačkoliv hybridní kalcitoniny také inhibovaly IMC, tyto látky zpožďovaly výskyt příští IMC pouze o jeden den a to i při nejvyšších zkoušených dávkách (100 $\mu\text{g/kg}$).

Naše výsledky konečně prokázaly, že hybridní kalcitoniny mají slabší účinky na gastrointestinální motilitu psů při vědomí, než lososí kalcitonin.

Tyto výsledky také nasvědčují tomu, že hybridní kalcitoniny budou pravděpodobně působit méně nežádoucích účinků na gastrointestinální systém než lososí kalcitonin.

Příklad 14

Křížová reakce mezi lidskou protilátkou anti-lososího kalcitoninu a hybridního kalcitoninu

Postup:

Lososí kalcitonin byl syntetizován běžným postupem syntézy v pevné fázi. Lososí kalcitonin značený ^{125}I byl připraven postupem podle Tejedora (Tejedor F. a Balles-ta J.P.G., Analytical Biochemistry, 127, 143-149 (1982)).

Čtyři druhy lidského séra, u kterých bylo ověřeno, že obsahují protilátky po podání lososího kalcitoninu byly získány od Dr. Fredericka R. Singera (Ceders-Sinai Medical Center). Titry protilátek těchto sér vůči lososímu kalcitoninu byly následující:

č.1	1:4000	č.2	1:8000
č.3	1:8000	č.4	1:2000

1) Stanovení stupně ředění séra

Jako tlumivý roztok pro reakci byl použit 0,1M roztok borátového pufru (pH 8,0), obsahující 0,5 % BSA, 0,9 % NaCl, 0,1 % NaN_3 a 0,05 % Tweenu 20. Tento tlumivý roztok, lidské sérum obsahující anti-lososí kalcitonin (ředěné tlumivým roztokem na konečné ředění 100 - 6400) a roztok značeného kalcitoninu byly vneseny do zkušební zkumavky (typ Spitz, Salsched Inc., o rozměrech 12 x 75 mm) v objemech uvedených níže, směs byla intenzívně míchána a ponechána stát přes noc při teplotě místnosti.

	*1	*2
i) reakční tlumivý roztok	300 μl	400 μl
ii) lidské sérum s antilososím kalcitoninem	100 μl	0 μl
iii) roztok značeného kalcitoninu (~ 20000 cpm)	100 μl	100 μl

* Celková vazba (B).

* Nespecifická vazba (NSB)

Reakční roztok byl dobře promíchán s 500 μl BGG (hovězí γ -globulin, Sigma), dále smíchán s 1 ml 25% PEG č. 6000, intenzívně míchán a pak ponechán stát při teplotě místnosti po dobu 15 minut. Reakční roztok byl pak odstředěn na nádobkové odstředivce (typ O5RP-22, Hitachi) při frekvenci otáčení 3000 min^{-1} po dobu 10 min při 4°C . Po odstranění supernatantu odsátím byla stanovena radioaktivita zbytku pomocí počítače gama částic. Výsledky jsou uvedeny na obr. 5.

2) Kompetitivní reakce mezi značeným ^{125}I lososím kalcitoninem a lososím kalcitoninem nebo hybridním kalcitoninem.

Reakční tlumivý roztok, různé typy kalcitoninů, lidské sérum s antilososím kalcitoninem a roztok značeného kalcitoninu byly vneseny do zkušební zkumavky v objemech uvedených níže a postupně zpracovány stejným způsobem jako při stanovení ředění séra.

	№1	№2	№3
i) reakční tlumivý roztok	200 /ul	400 /ul	300 /ul
ii) kalcitonin	100 /ul	0 /ul	0 /ul
iii) lidské sérum s antilososím kalcitoninem	100 /ul	0 /ul	100 /ul
iv) roztok značeného kalcitoninu ($\approx$ 20000 cpm)	100 /ul (B')	100 /ul (NSB)	100 /ul (Bo')

Byly zkoušeny dva hybridní kalcitoniny: 1. (1-16)lidský/(17-32)lososí kalcitonin, 2. (1-21)lidský/(22-32)lososí kalcitonin.

Výsledky jsou uvedeny na obr. 6-9.

Výsledky a diskuse:

Pokus byl proveden ke zjištění, zda značený ^{125}I lososí kalcitonin je schopný konkurovat lososímu kalcitoninu ve vazbě na anti-lososí kalcitonin v lidském séru č. 1 (obr.5). Podobné křivky byly získány při použití anti-lososích kalcitoninů lidský sér č.2-4. Tyto výsledky ukazují, že lososí kalcitonin začíná konkurovat značenému kalcitoninu v dávce alespoň 1 ng/ml.

Pokusy se čtyřmi typy sér prokázaly, že ani hybridní kalcitonin 1 ani hybridní kalcitonin 2 se neúčastnil reakce s antilososím kalcitoninem lidského séra.

Lze proto učinit závěr, že hybridní kalcitonin podle vynálezu lze potenciálně použít jako účinné léčivo u pacientů, kteří produkují anti-lososí kalcitoninové protilátky.

Hybridní kalcitonin podle vynálezu má vynikající výhodu v tom, že vykazuje stejně silné biologické účinky jako lososí, úhoří a hovězí kalcitoniny, přičemž nemá vedlejší účinky, zahrnující nevolnost, pětíze funkcí zažívacího traktu a antigenicitu. Má také další výhodu ve zpracování v tom, že vedlejším reakcím, které by jinak mohly vznikat během syntézy lze zabránit výměnou Met⁸ u lidského kalcitoninu za Val⁸.

č.j.	0 2 5 3 4 0
hosta	22. V. 91
ÚŘAD PRO VYNALEZY A OBJEVY	
Pril.	

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Hybrid kalcitoninu složený ze dvou peptidových segmentů, z nichž jeden je peptidový segment v lidském kalcitoninu nebo analogu lidského kalcitoninu, který je umístěn na místě bližším k aminoterminálnímu konci a druhý, který je peptidovým segmentem v kalcitoninu odvozeném od živočicha jiného než člověka a je umístěn na místě bližším karboxyterminálnímu konci.

2. Hybridní kalcitonin podle nároku 1, kde peptidový segment na místě bližším aminoterminálnímu konci obsahuje nejméně 10 aminokyselinových zbytků v lidském kalcitoninu a peptidový segment na místě bližším karboxyterminálnímu konci obsahuje nejméně 6 aminokyselinových zbytků v kalcitoninu odvozeném od živočichů jiných než lidí.

3. Hybridní kalcitonin podle nároku 1, kde lidským kalcitoninem je přírodní lidský kalcitonin nebo jeho analog a kalcitonin živočišného původu jiného než lidského je přírodní kalcitonin nebo jeho analog.

4. Hybridní kalcitonin podle nároku 1, kde nehumánní kalcitonin je získán z lososa, úhoře nebo kuřete.

5. Hybridní kalcitonin, složený z peptidového segmentu v lidském kalcitoninu a peptidového segmentu v kalcitoninu živočišného původu jiného než lidského, kde první peptidový segment zahrnuje první až n-tý ($n = 10-28$) aminokyselinové zbytky z aminoterminálního konce a druhý peptidový segment obsahuje následující aminokyselinové zbytky směrem ke karboxyterminálnímu konci.

6. Hybridní kalcitonin podle nároku 5, kde první peptidový segment obsahuje první až n-tý ($n=13-21$) aminokyselinové zbytky z aminoterminálního konce a je buď peptidovým segmentem v přirozeném lidském kalcitoninu nebo peptidový segment v lidském kalcitoninovém analogu, který má nejvýše dva aminokyselinové zbytky nahrazeny, vypuštěny z nebo přidány k peptidovému segmentu v přirozeném lidském kalcitoninu.

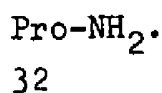
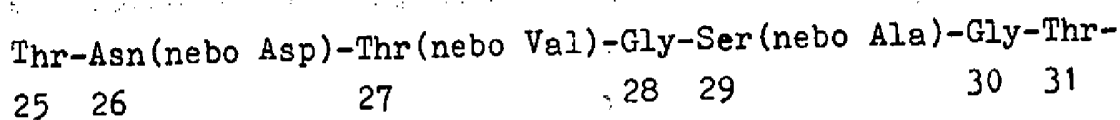
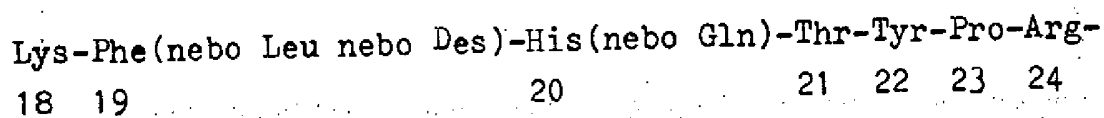
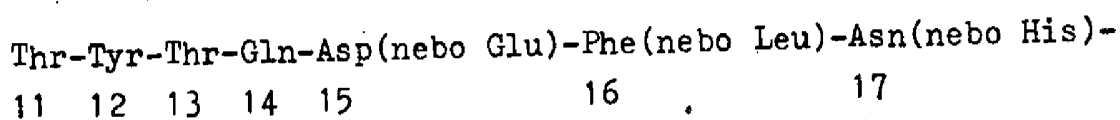
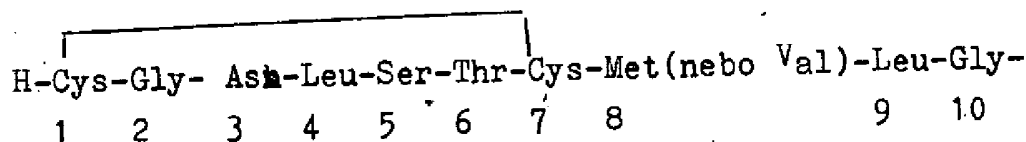
7. Hybridní kalcitonin podle nároku 6, kde peptidový segment v analogu lidského kalcitoninu má valinový zbytek na místě methioninového zbytku v poloze 8 v přirozeném lidském kalcitoninu.

8. Hybridní kalcitonin podle nároku 5, kde druhý peptidový segment obsahuje n-tý ($n=14-22$) a následující aminokyselinové zbytky od aminoterminálního konce lososího, úhořího nebo kuřecího kalcitoninu a je buď peptidovým segmentem v přirozeném lososím, úhořím nebo kuřecím kalcitoninu nebo peptidovým segmentem v analogu kalcitoninu, který má nejvýše tři aminokyselinové zbytky nahrazeny, vypuštěny z nebo přidány k peptidovému segmentu v přirozeném lososím, úhořím nebo kuřecím kalcitoninu.

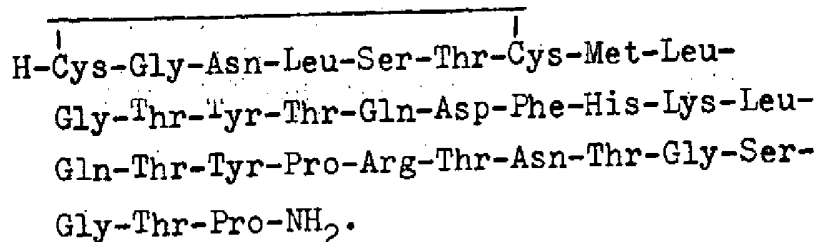
9. Hybridní kalcitonin podle nároku 8, kde druhým peptidovým segmentem je peptidový segment v přirozeném lososím nebo úhořím kalcitoninu nebo peptidový segment v analogu kalcitoninu, který má jeden aminokyselinový zbytek nahrazen nebo vypuštěn z peptidového segmentu v přirozeném lososím nebo úhořím kalcitoninu.

10. Hybridní kalcitonin, ve kterém sekvence prvního až šestnáctého aminokyselinového zbytku od aminoterminálního konce je stejná jako sekvence prvního až šestnáctého aminokyselinového zbytku v přirozeném lidském kalcitoninu a sekvence sedmnáctého až třicátého druhého aminokyselinového zbytků je stejná jako sekvence sedmnáctého až třicátého druhého aminokyselinového zbytku v přirozeném lososím nebo úhořím kalcitoninu.

11. Hybridní kalcitonin, mající následující strukturní vzorec



12. Hybridní kalcitonin podle nároku 11, který má následující strukturní vzorec



13. Hybridní kalcitonin podle nároku 11, který má následující strukturní vzorce

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,

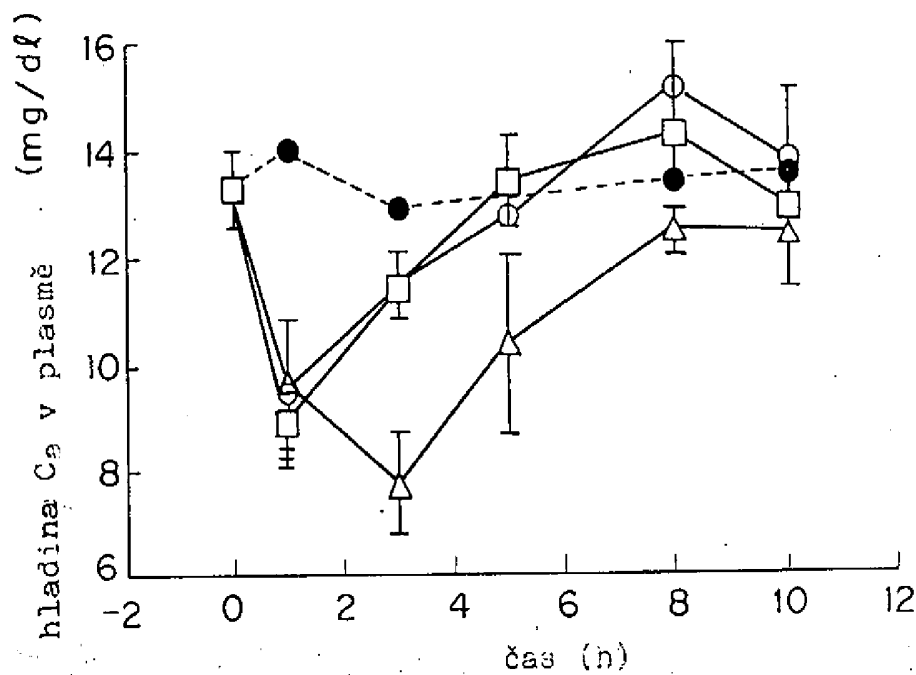
H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-
Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Lys-Leu-
Gln-Thr-Tyr-Pro-Arg-Thr-Asp-Val-Gly-Ala-
Gly-Thr-Pro-NH₂,

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,

H-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 a

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.

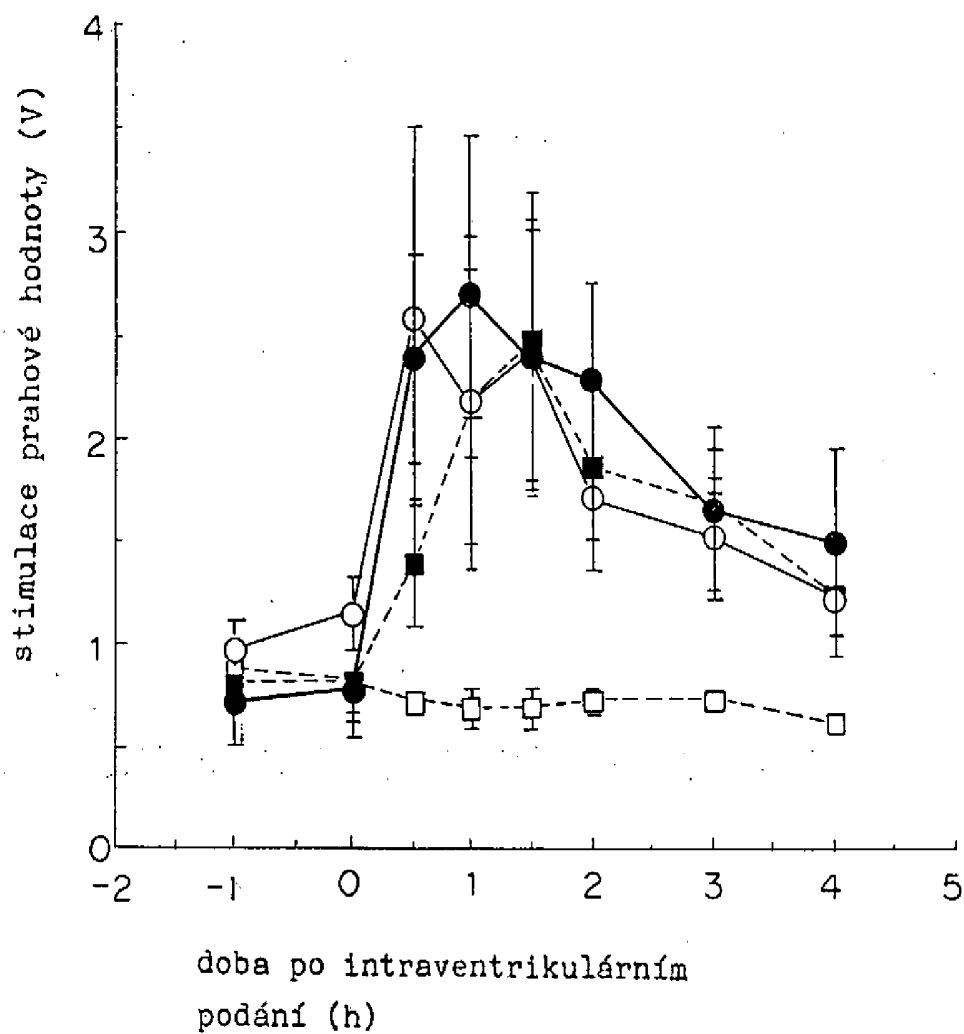
Obr. 1



- kontrola
 —○— hybridní kalcitonin 1
 —△— lososí kalcitonin
 —□— lidský kalcitonin

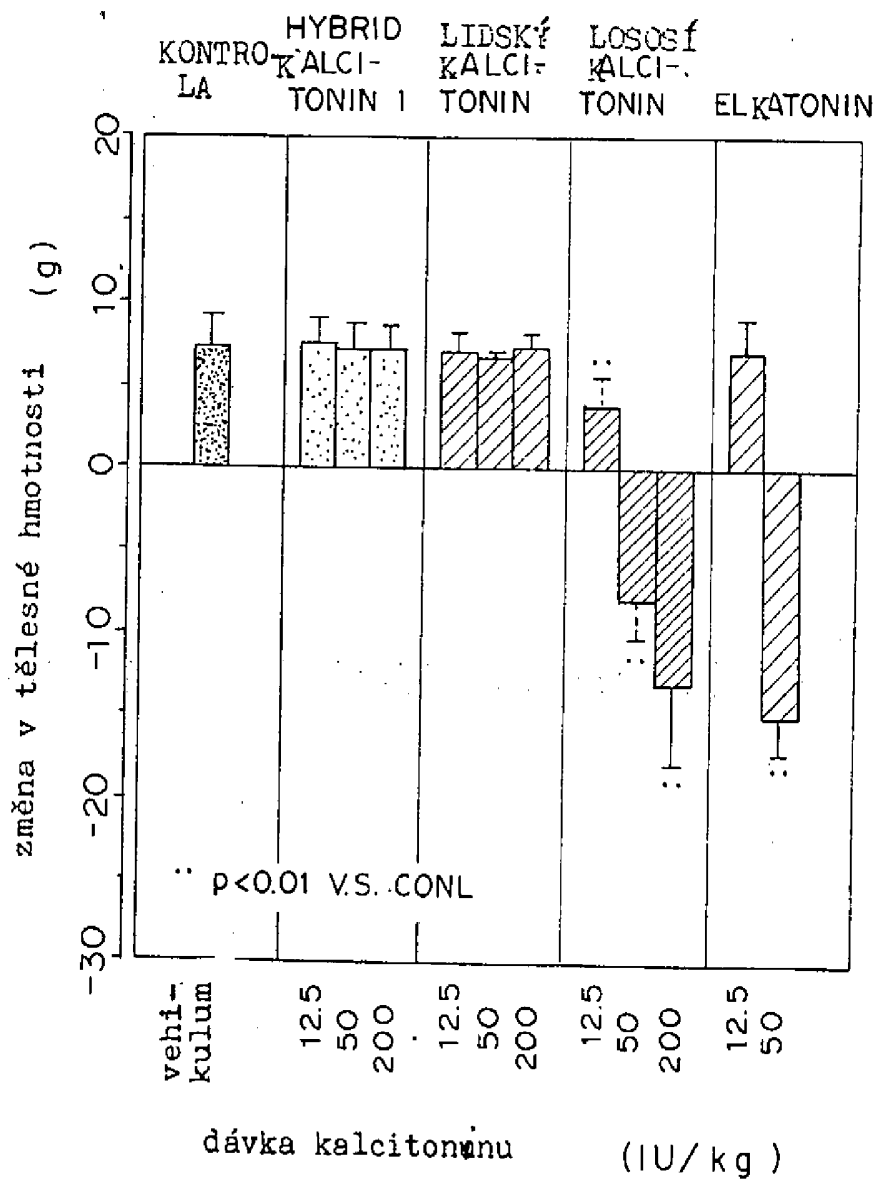
PRIL
7. OBJEVY
PRO VYKALIZY
04AD
2. 2. 91
0000
0 2 5 2 4 0
21

Obr. 2

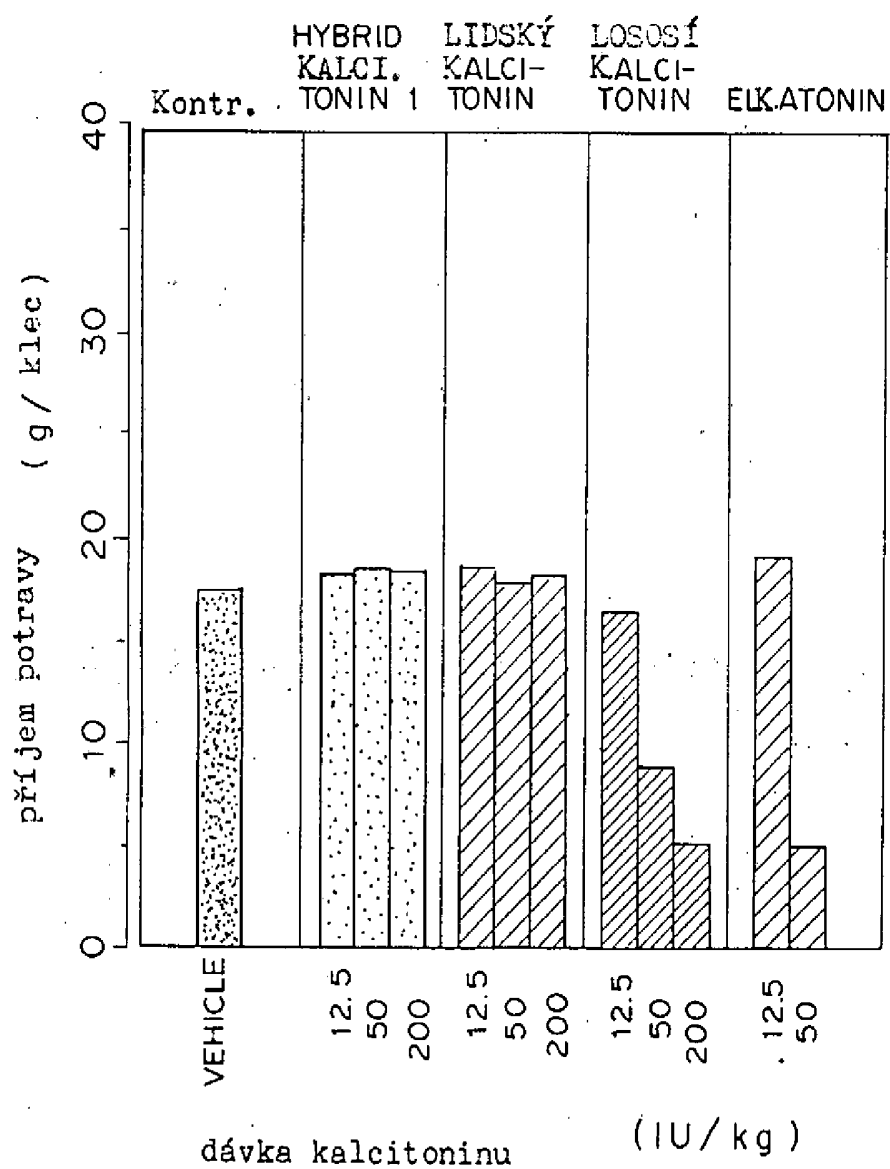


- FYZIOLOGICKÝ SOLNÝ ROZTOK
- LOSOSÍ KALCITONIN
- LIDSKÝ KALCITONIN
- HYBRID KALCITONIN 1

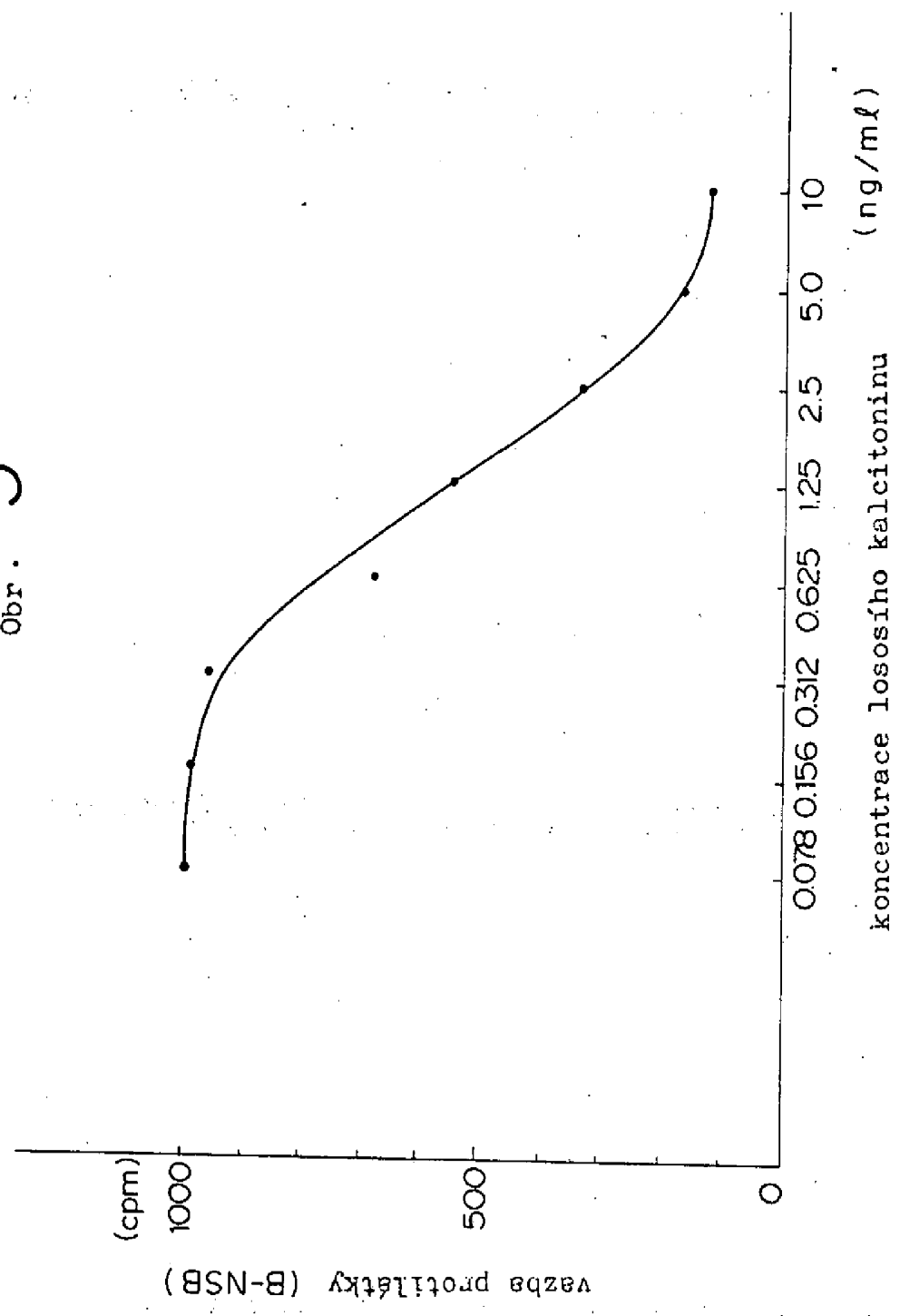
Obr. 3



Obr. 4

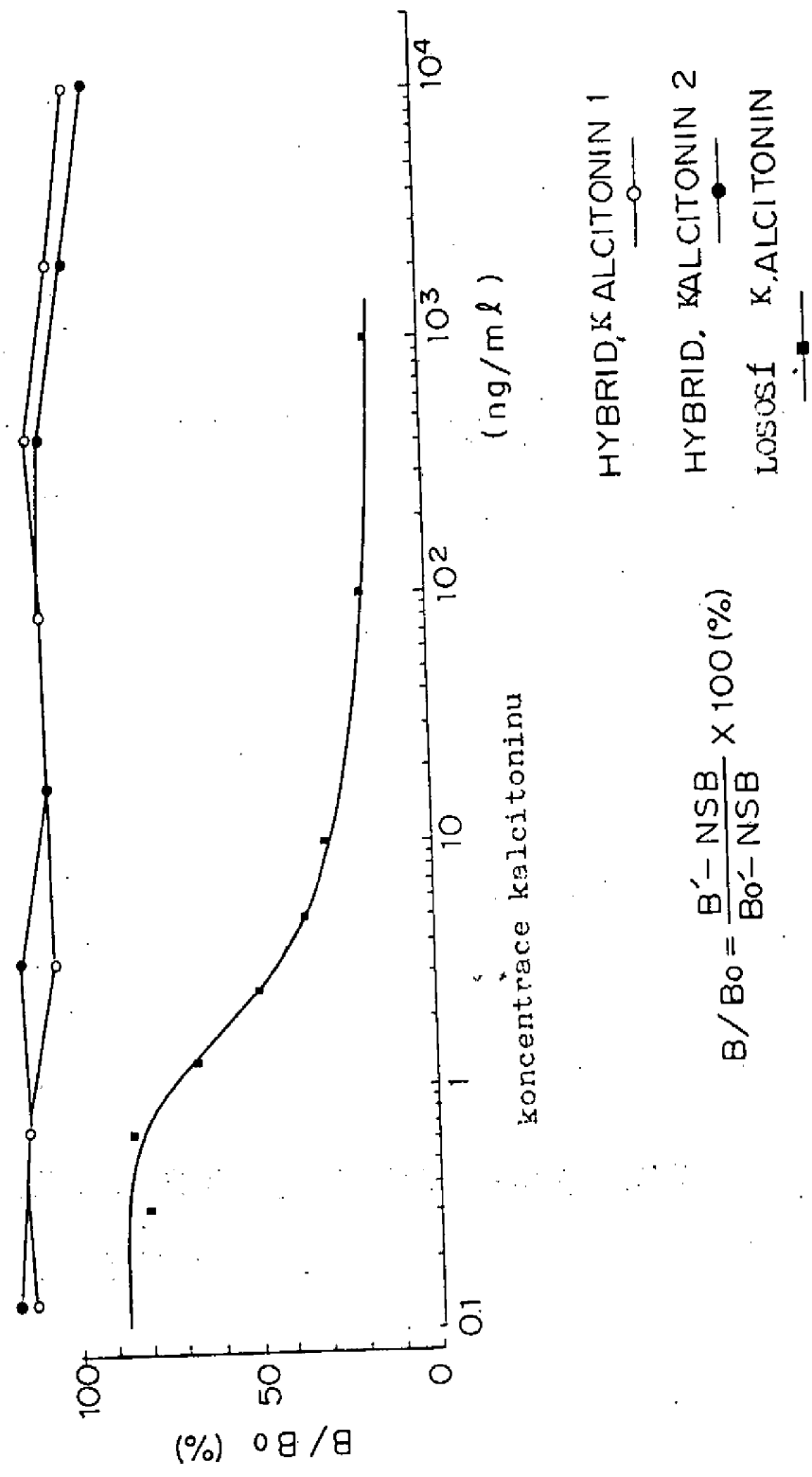


Obr. 5



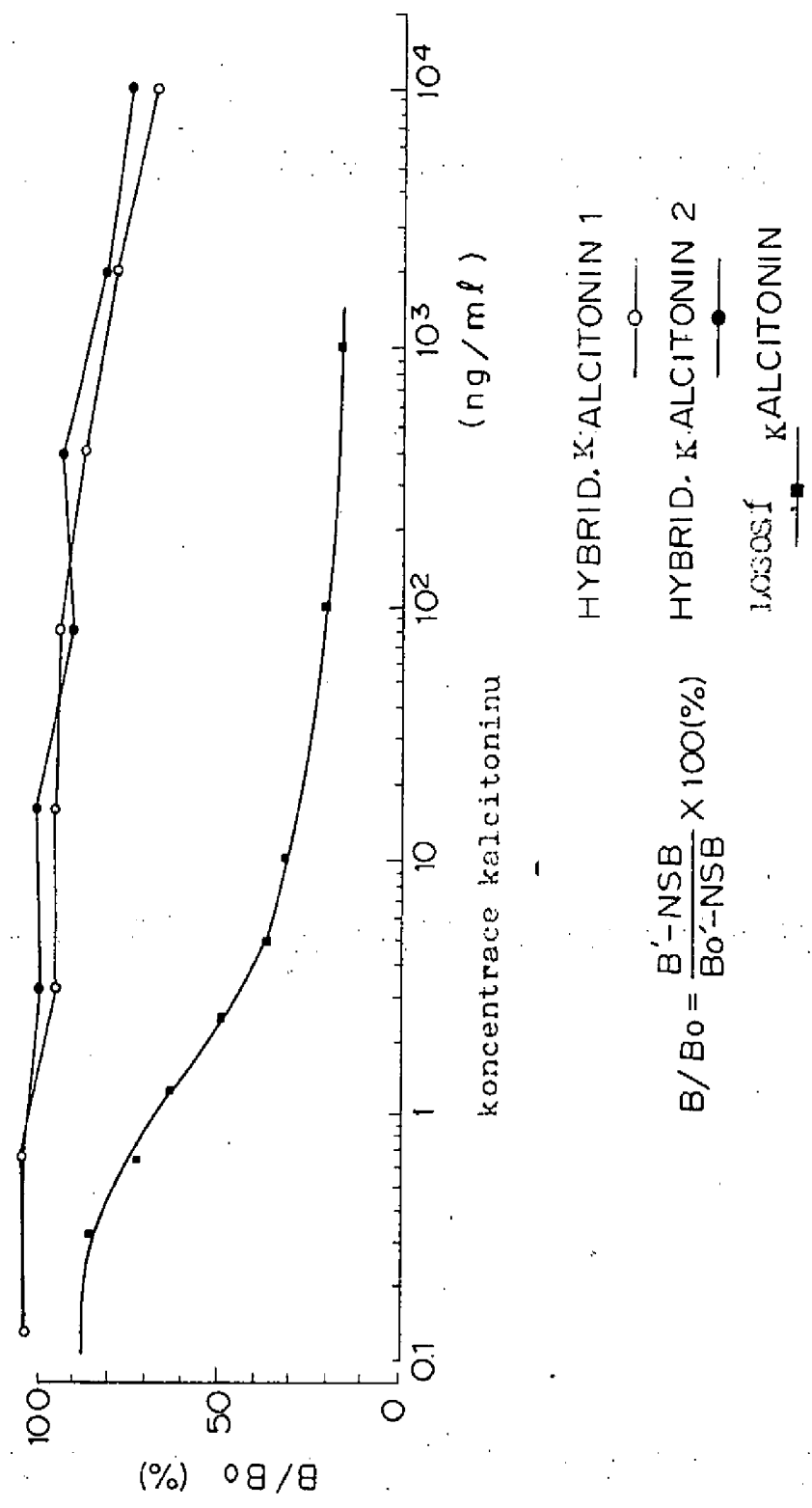
Obr. . 6

① SERUM 2.1



Obz. 7

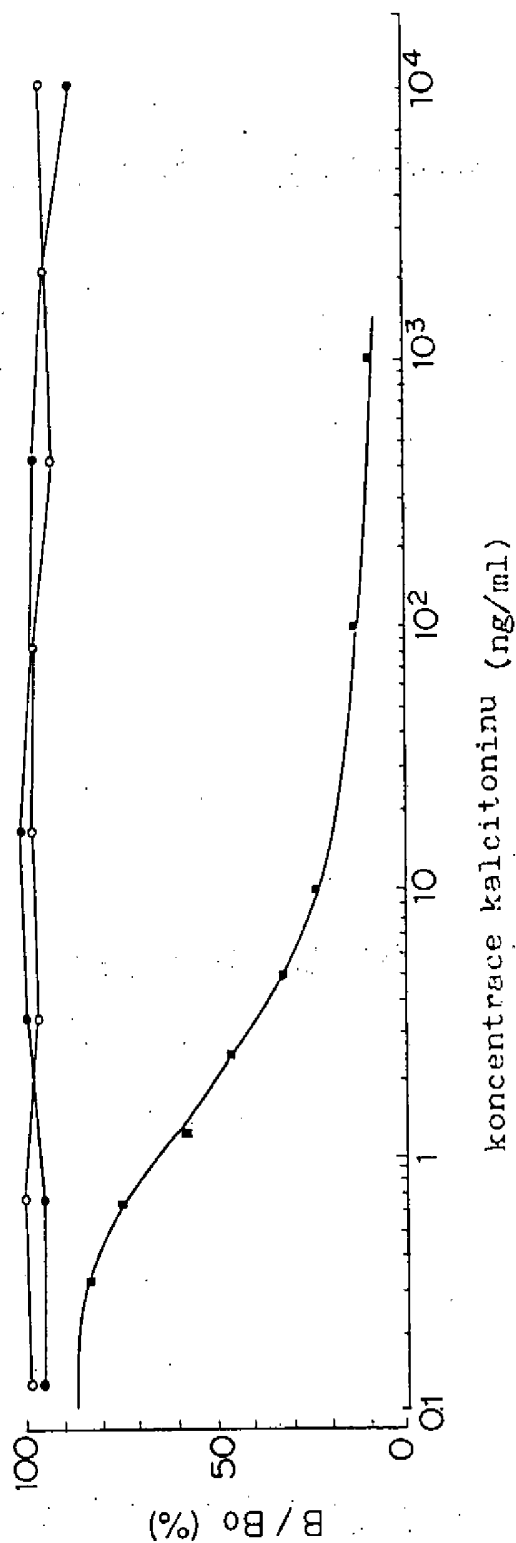
② SERUM 2.2



8

③ SERUM č.3

Obz.



HYBRID. KALCITONIN 1

HYBRID. KALCITONIN 2

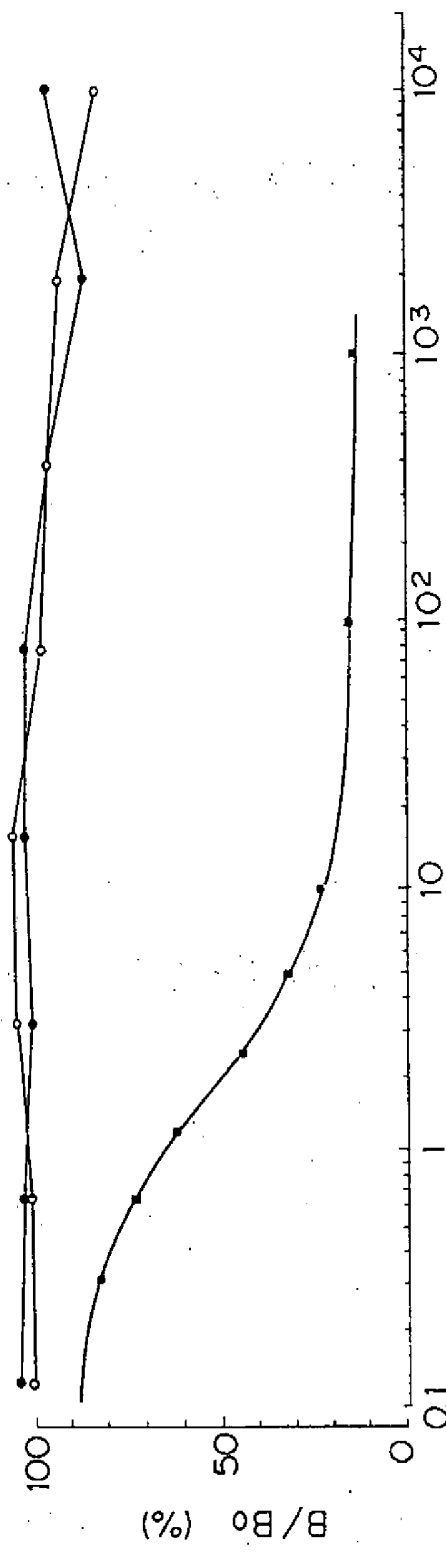
LOSOSIF KALCITONIN

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

894-41

Obr. 9

④ SERUM č. 4



(ng/ml)

konzentrace kalcitoninu

HYBRID. KALCITONIN 1

HYBRID. KALCITONIN 2

LOSOSÍ KALCITONIN

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

025340	22 V 91	ÚŘAD PRO VYKALCIZY A OBLJEVY	FILE
--------	---------	------------------------------------	------