

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

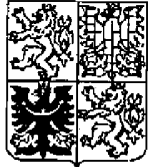
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

347-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01. 08. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **02.08.96, 14.03.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/691647, 97/040560**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 07. 99**
(Věstník č. 7/99)

(86) PCT číslo: **PCT/CA97/00547**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/05683**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 K 14/635

(71) Přihlášovatel:

NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF
CANADA, Ottawa, CA;

(72) Původce:

Barbier Jean-René, Gatineau, CA;

Morley Paul, Ottawa, CA;

Neugebauer Witold, Ottawa, CA;

Ross Virginia, Gloucester, CA;

Whitfield James, Ottawa, CA;

Willick Gordon E., Orleans, CA;

(74) Zástupce:

Kania František Ing., Mendlovo nám. 1a,
Brno, 60300;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Analogy paratyroidního hormonu pro léčbu
osteoporézy**

(57) Anotace:

Jsou popsány analogy lidského parathyreoidního hormonu, které vykazují zvýšené aktivity při obnově kostí a zvýšenou biologickou dostupnost. Peptidy jsou popsány jako deriváty hPTH-/1-31/, které jsou zacyklovány například tvorbou laktamů mezi buď Glu²² a Lys²⁶ nebo Lys²⁶ a Asp³⁰. Dále přirozený Lys²⁷ může být substituován buď Leu nebo hydrofóbními zbytky, například Ile, norleucin, Met, Val, Ala, Trp nebo Phe. Pro tyto analogy je typická zlepšená schopnost stimulovat adenylycyklázu v krysích osteosarkomických buňkách a vykazují zvýšené aktivity při obnově kostí u modelu kryš zbařených vaječníků. Analogy také vykazují zlepšené aktivity a biologickou dostupnost, což dokazují jejich hypotenzivní účinky. Je také popsána zkouška porovnávající hypotenzivní aktivitu s osteogenní aktivitou.

CZ 347-99 A3

20.04.99

017-11
287/88

Analogy paratyroidního hormonu pro léčení osteoporózy

Oblast techniky

Vynález se týká analogů lidského paratyroidního hormonu, o nichž se zjistilo, že jsou účinné při léčení osteoporózy.

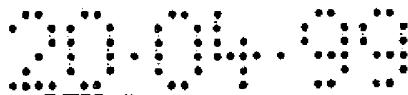
Dosavadní stav techniky

Osteoporóza je vedoucí příčinou neschopnosti starých lidí, zejména starších žen. Nedávno se zjistilo, že lidský paratyroidní hormon (hPTH) a jeho jisté analogy jsou stimulatory růstu kostí, takže jsou užitečné při léčení osteoporózy. Osteoporóza je progresivní nemoc, která vede k redukci celkové hmoty kostí a zvýšené křehkosti kostí. To často vede ke spontánním zlomeninám kostí nesoucích zátěž a k fyzickému a mentálnímu zhoršení charakteristik znehýbnujících poranění. Postmenopausální osteoporóza je způsobena vymizením estrogenů, které podněcují desetiletí trvající urychlení obměny kostí se zvýšenou nerovnováhou mezi resorbci starých kostí a tvořením nové kosti. To vede k zřídnutí, zvýšené porózitě a trabekulární redukci kostí nesoucích zátěž. Osteoporóza je také spojena s hypertyroidismem, hyperparatyroidismem, Cushingovým syndromem a užíváním jistých steroidních léků. Léčení historicky zahrnovalo zvýšení vápníku v jídle, léčení estrogeny, zvýšené dávky vitamínu D, avšak hlavně léky jako antiresorbiva, která inhibují resorpci kostí osteoklasty.

Paratyroidní hormon (PTH) vzniká v příštítné žláze a je hlavním regulátorem hladin vápníku v krvi. PTH polypeptid a syntetický polypeptid lze připravit způsobem popsaným Erickson a Merrifield, *The Proteins*. Neurath aj., Eds., Academic Press, New York, 1976, strana 257, a modifikovaným způsobem Hodges aj., *Peptide Research* 1, 19 nebo Atherton, E. a Sheppard, R.C. *Solid Phase Peptide Synthesis*, IRL Press, Oxford, 1989.

Když se sérový vápník sníží pod normální hladinu, příštítná žláza uvolňuje PTH a hladina vápníku se zvýší resorbci kostního vápníku, zvýšenou absorpcí vápníku z vnitřností a zvýšenou absorpcí vápníku v ledvinách ze vznikající moči v ledvinových kanálcích. Ačkoliv kontinuální infuze nízkých hladin PTH mohou odstraňovat vápník z kostí, stejně nízké dávky, když se injikují přeržitě, mohou skutečně podporovat růst kostí.

Trager, US patent 4,086,196 popisuje analogy lidského PTH a tvrdí, že prvé 27 až 34 aminokyseliny jsou nejučinnější s ohledem na stimulaci adenynylcyklázy v pokusu s buňkami *in vitro*. Rosenblatt, US patent 4,771,124 popisuje vlastnosti hPTH analogů, kde Trp²³ je substituován aminokyselinami: fenylalaninem, leucinem, norleucinem, valinem, tyrosinem, β-



naftylalaninem nebo α -naftylalaninem, jako antagonistu PTH. Tyto modifikované analogy PTH také mají odstraněny 2 a 6 koncové aminokyseliny, což vede k ztrátě většiny aktivity antagonisty, když se použijí k léčení osteoporózy. Tyto analogy se navrhovaly jako inhibitory PTH a peptidu příbuzného PTH. Analogy se nárokovaly jako pravděpodobně užitečné při léčení hyperkalcemie spojené s některými tumory.

Pang aj., WO93/06845 publikované 15. dubna 1993, popisují hPTH analogy, kde jsou substituovány Arg²⁵, Lys²⁶, Lys²⁷ četnými aminokyselinami, včetně alaninu, asparaginu, asparagové kyseliny, cysteinu, glutaminu, glutamové kyseliny, glycinu, histidinu, isoleucinu, leucinu, methioninu, fenylalaninu, prolinu, serinu, threoninu, tryptofanu, tyrosinu nebo valinu. Ty se nárokují bez žádných podpůrných údajů ze zvířecích nebo lidských testů, že jsou účinné při léčení osteoporózy s minimálními účinky na krevní tlak a hladké svaly.

PTH působí aktivací dvou druhých mediátorových soustav?, adenynyl cyklázy aktivované G_s-proteinem a fosfolipázy C_{beta} aktivované G_q-proteinem. Poslední vede ke stimulaci aktivity protein kinázy Cs (PKC) vázané na membránu. Ukázalo se, že aktivita PKC vyžaduje PTH zbytky 29 až 32 (Jouishomme aj. (1994) J. Bone Mineral Res. 9, 1197-1189). Zjistilo se, že zvýšený růst kostí, například účinek, který je užitečný při léčení osteoporózy, je spojen se schopností peptidového řetězce zvyšovat aktivitu AC. Zjistilo se, že nativní řetězec PTH má všechny tyto aktivity. Typický řetězec hPTH-(1-34) je ukázán jako (A):

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu

Gln Asp Val His Asn Phe-OH A

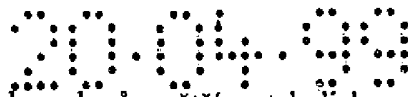
Následující lineární analog hPTH-(1-31)-NH₂, jehož údaje jsou zahrnuty v tabulce 1 níže, má pouze aktivitu stimulující AC a zjistilo se, že je zcela aktivní při obnově kostí v modelu krys s odstraněnými vaječníky (Rixon, R. H. aj., (1994) J. Bone Mineral Res. 9, 1197-1189, Whitfield aj. (1996) Calcified Tissue Int. 58, 81-87, Willick aj., US patent 5,556,940 vydaný 17. září 1996)):

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu

Gln Asp Val-NH₂ B

Molekula B výše může mít karboxylové zakončení místo ukázaného aminové zakončení.



Předmětem tohoto vynálezu je příprava nových analogů s větší metabolickou stabilitou, se zvýšenou aktivitou obměny kostí, se zvýšenou AC aktivitou a s minimálními postranními účinky.

Podstata vynálezu

Podle jednoho aspektu vynálezu se zabezpečuje lidský paratyroidní hormon hPTH a jeho farmaceuticky přijatelné soli mající řetězec aminokyselin:

R-NH-R1-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-R2-His-Asn-Leu-Gly-Lys-R3-R4-R5-R6-R7-Glu-Arg-Val-R8--Trp-Leu-R9--R10-R11-Leu-R12-Asp-Y

kde

R = vodík nebo jakákoliv lineární nebo rozvětvená alkylová, acylová nebo arylóvá skupina,

R1 = Ser, Ala nebo Aib,

R2 = Met nebo přirozeně se vyskytující hydrofobní aminokyselina,

R3 = His nebo ve vodě rozpustná aminokyselina,

R4 = Leu nebo ve vodě rozpustná aminokyselina,

R5 = Asn nebo ve vodě rozpustná aminokyselina,

R6 = Ser nebo ve vodě rozpustná aminokyselina,

R7 = Met nebo přirozeně se vyskytující hydrofobní aminokyselina,

R8 = Glu, Lys nebo Asp,

R9 = Cys, Glu nebo Orn,

R10 = Arg, Lys, Orn, Gln, Glu nebo Asp,

R11 = přirozeně se vyskytující hydrofobní nebo polární aminokyselina,

R12 = Gln, Arg, Glu, Asp, Lys nebo Orn,

X = OH, NH₂ a

Y = X, Val-X, Val-His-X, Val-His-Asn-X, Val-His-Asn-Phe-X, Val-His-Asn-Phe-Val-X, Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-X, Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu-X, cyklizované jako mezi jedním nebo dvěma páry aminokyselin 22 a 26, 26 a 30, 27 a 30 a 25 a 29, když R3 a R6 jsou



Lys, Orn, Glu nebo Asp, s výjimkou cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰) (Leu²⁷)-hPTH-(1-34)-NH₂, cyklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-34)-NH₂ a cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)(Leu²⁷)-hPTH-(1-34)-OH.

Příklady solí zahrnují anorganické soli, soli organických kyselin, například kyseliny mravenčí, kyseliny octové, kyseliny vinné a kyseliny citronové, soli anorganických bazí, jako sodné a amonné soli, a soli organických bazí, jako triethylamin, ethylamin a methylamin.

Podle jiného rysu vynálezu se cyklizace dosahuje tvorbou laktamů vznikajících spojením bočních řetězců vybraných párů zbytků aminokyselin, například mezi přirozenými zbytky 22 a 26 nebo 26 a 30. Berou se v úvahu i jiné typy cyklizace, jako tvorba disulfidického můstku například mezi analogy obsahujícími Cys Cys²²-Cys²⁶ a Cys²⁶-Cys³⁰.

Také se zjistilo, že jsou účinné substituce různých aminokyselin. Lys²⁷ se může nahradit Leu nebo různými hydrofobními nebo polárními zbytky. Jiným faktorem je to, jak dobře zbytek se hodí k receptoru. Ala není tak hydrofobní jako Leu. Lys a Tyr se obecně považují za polární, avšak přesto mají hydrofobní interakce s receptorem. Například Lys se může složit, tak že hydrofobní část reaguje s jinými hydrofobními zbytky receptoru, a NH₂ je vystaveno rozpouštědлу. Takové substituce zahrnují ornithin, citrullin, kyselinu α-aminomáselnou, norleucin, isoleucin a tyrosin, nebo jakákoliv lineární nebo rozvětvenou α-amino alifatickou kyselinu mající 2-10 uhlíků v postraním řetězci, jakýkoliv takový analog mající polární nebo nabitou skupinu na konci alifatického řetězce. Příklady polárních nebo nabitých skupin zahrnují amino, karboxyl, acetamido, guanido a ureido. Ačkoliv se zdá, že Leu²⁷ je nejlepší substituce, také se zdá, že řada jiných substitucí v poloze 27 si zachovává téměř plnou aktivitu a také by mohla mít žádané vlastnosti, jako zvýšenou proteolytickou stabilitu nebo rozpustnost ve vodě. Očekává se, že neaktivnější budou Ile, norleucin, Met a ornithin.

Tato substituce vede ke stabilizaci α-šroubovnice v oblasti hormonu vázající receptor. To se potvrdilo studiem cirkulárního dichroismu spektra laktamových analogů ve srovnání se spektry cirkulárního dichroismu lineární molekuly (Leu²⁷)-hPTH-(1-34)-NH₂. Spektra cirkulárního dichroismu jsou velmi citlivá k přítomnosti sekundární struktury α-šroubovnice a technika se použila k ukázaní přítomnosti α-šroubovnice ve fragmentech hPTH-(Neugebauer aj. (1991) *Biochemistry*, 31, 2056-2063). Mimoto byla ukázána stabilizace α-šroubovnice tvorbou shora zmíněných laktamů v hPTH-(20-34)-NH₂ (Neugebauer aj., (1994) *Int. J. Protein Peptide Res.*, 43, 555-562). Existuje možná amfifilní α-šroubovnice mezi zbytky 21 a 31 hPTH-(1-34)-NH₂ a byly představeny údaje ukazující, že hydrofobní strana šroubovnice reaguje s PTH



receptorem (Neugebauer, W. (1995) *Biochemistry*, 34, 8835-8842, Gardella, T. J. aj., (1993) *Endocrinology* 132, 2024-2030).

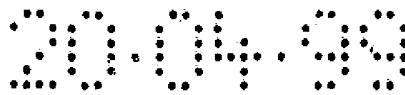
Zjistilo se, že neúčinnější cyklizace vyžadují tvorbu laktamu, například mezi zbytky Glu²² a Lys²⁶ nebo Lys²⁶ a Asp³⁰. Jiné cyklizace jsou rovněž možné, jako mezi Lys²⁷ a Asp³⁰, ačkoliv se zjistilo, že tento laktam má nějaký destabilizující účinek na α -šroubovnicí.

Studie fragmentů PTH vázajících se na receptor blíže naznačily hlavní vázající oblast mezi zbytky 14-34¹. Navrhli jsme, že zbytky 17-29 α -šroubovnice se váží jako takové na PTH receptor a že amfifilní část této α -šroubovnice se váže svou hydrofobní stranou na receptor². Tento model je shodný s výsledky studia analogů vázající oblasti receptoru³.

Studie NMR ukázaly, že i modelový peptid, o němž se zjistilo, že je vysoce helikální pomocí CD, také obsazuje řadu nehelikálních konformací. Tedy strukturu peptidického hormonu vázaného na receptor, například PTH, nelze spolehlivě odvodit z jeho volné struktury v roztoku. Stericky bráněné analogy peptidického hormonu se použily k omezení počtu konformačních stavů dostupných pro peptid⁸. Výzkum řetězce hPTH ukazuje 3 možné solné můstky mezi zbytky 17-29, což by mohlo jak stabilizovat, tak destabilizovat α -šroubovnicí. Ty jsou mezi Glu²² a Lys²⁶ a Lys²⁶ a Asp³⁰. Očekává se, že oba stabilizují α -šroubovnicí. Očekává se, že mezi Lys²⁷ a Asp³⁰ destabilizují α -šroubovnicí⁴. Tvorba laktamu mezi těmito páry zbytků by omezila konformace dostupné pro hPTH v této oblasti α -šroubovnice. Mimoto dva z těchto laktamů, Glu²²-Lys²⁶ a Lys²⁶-Asp³⁰, o kterých se očekává, že stabilizují strukturu α -šroubovnice, jsou položeny na polární straně amfifilní části α -šroubovnice. Očekává se, že třetí Lys²⁷-Asp³⁰ aspoň částečně destabilizuje α -šroubovnicí, a zahrnuje zbytek Lys²⁷, který je na hydrofobní straně amfifilní šroubovnice. K cyklizaci mezi polohami 25 a 29 může také dojít, pokud Lys nebo Orn nahradí Arg v poloze 25 a pokud se Gln²⁹ nahradí Glu nebo Asp.

Substituce Leu za Lys²⁷ vede k hydrofobnějším zbytkům na hydrofobní straně amfifilní šroubovnice. To vede ke zvýšené stimulaci aktivity adenynyl cyklázy v buněčné linii ROS. Odborníci poznají, že jiné takové substituce diskutované výše by asi vedly k analogům se stejnými zvýšenými aktivitami.

Očekává se, že kombinovaný účinek buď substituce, nebo tvorby laktamu bude stabilizovat α -šroubovnicí a zvyšovat bioaktivitu a chránit tuto oblast molekuly proti proteolytické degradaci. Dává se přednost přítomnosti amidu na C-konci v tom smyslu, že se dále očekává, že to dále chrání peptid proti exoproteolytické degradaci, ačkoliv mohou být



hydrolyzovány některými peptidázami (Leslie, F. M. a Goldstein, A. (1982), *Neuropeptides*, 2, 185-196).

Také se zjistilo, že lze užitečně provádět jiné substituce aminokyselin. Jmenovitě jsme nahradili zbytek Met citlivý k oxidaci v polohách 8, 18 přirozeně se vyskytujícím hydrofobním zbytkem, Nle, jako v japonské patentové publikace 61-24598. Také lze očekávat, že jiné hydrofobní zbytky, jako Leu, Ile, Val, Phe a Trp by byly užitečné jako podle USP 5,393,869 pro Nakagawa aj..

Také jsou brány v úvahu reversní laktamy. Ukázali jsme účinnost změny Lys²²-Glu²⁶. Lze tedy očekávat, že lze užitečně provádět podobné změny mezi laktamy 26-30 a 27-30.

Lze provádět, vedle dříve zmíněných Cys-Cys i jiné substituce na výhodném místě laktamů 22-26, například Asp²²-Orn²⁶, aby se osvětlilo, že lze připravit různá místa cyklizace/ velikosti kruhu.

V USP 5,393,869 pro Nakagawa aj. a v USP 5,434,246 pro Fukuda aj. se uvádí, že některé substituované analogy hPTH mají podstatnou AC aktivitu a mohou mít zvýšenou stabilitu proti proteolytickému ataku, jmenovitě:

1. Ser-1 na Aib (kyselina α -aminomáselná),
2. Lys-27 na Gln (uvádí se, že má 2,5 x AC aktivitu),
3. Zbytky 14, 15, 16, 17 na Lys vcelku nebo v části 9 (uvádí se, že má silně zvýšenou aktivitu - až 8 x). To může být způsobeno zvýšenou rozpustností ve vodě. Očekává se, že in vivo budou labilnější k enzymům podobným trypsinu. Nárokují tento tetrapeptid (zbytky 14-17 včetně) tak, aby v něm byla alespoň jedna aminokyselina rozpustná ve vodě. Například His-14 nebo Lys-14, Leu-15, Lys-15 nebo Arg-15, Asn-16, Orn-16, Hci (homocitrullin)-16, Asp-16, Arg-16, Lys-16, DLys-16, Ser-16 nebo Gly-16, a 17-Ser, 17-Lys, 17-Asp nebo 17-Arg. Například také mohou zahrnovat Glu.
4. Arg 25 na His, aby se minimalizoval atak proteázou. Protože naše laktamy, zejména s Leu nebo jinou hydrofobní aminokyselinou v poloze 27, se mohou stát poněkud nerozpustnými a také nesnadno rozpustnými, mohlo by se očekávat, že stejné substituce budou užitečné v našich laktamech.

Odborníci také poznají, že i když se může dávat přednost cyklickým 1-31 hPTH, také se očekává podle zde ukázaných údajů, že cyklické fragmenty v rozsahu 1-30 až 1-37 také budou účinné. Zejména v literatuře neexistuje žádný důkaz, že přítomnost dalších aminokyselin až do

37 ovlivňuje biologické vlastnosti hormonu, zejména podle zde zahrnutých potvrzujících údajů 1-34.

Laktamy podle tohoto vynálezu lze připravit známými způsoby popsanými níže a lze je použít k stimulaci růstu kostí, pro obměnu kostí, pro hojení kostí v různých situacích, jako je léčení osteoporózy a běžných zlomenin.

Popis obrázků

Obr. 1 ukazuje strukturu lidského paratyroidního hormonu PTH, zbytky 1-31 (SEQ ID NO : 1).

Obr. 2 ukazuje strukturu (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 3).

Obr. 3 ukazuje strukturu (Leu²⁷)cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 4).

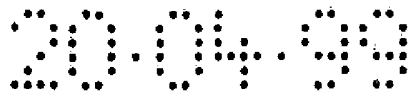
Obr. 4 ukazuje aktivity analogů podle vynálezu při stimulaci adenynyl cyklázy v buňkách ROS 17/2.

Obr. 5 ukazuje reprezentativní histologické řezy kostí připravených na konci 8 týdnů po OVX, což osvětluje různé schopnosti hPTH-(1-31)-NH₂ a jeho laktamových derivátů zabránit ztrátě kosti a stimulovat růst kostí u Sprague-Dawley krys s odstraněnými vaječníky (OVX).

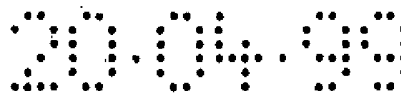
Obr. 6 ukazuje trabekulární objem kostí u kontrolních zvířat a u zvířat ošetřených hPTH analogem u krys původně silně zbavených kostí. Ošetření zvířat počalo 9 týdnů po OVX. Nejúčinnější z fragmentů byl (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂, který obnovil kosti na hodnoty normálních kontrolních krys.

Obr. 7 ukazuje trabekulární tloušťka krysích femurů pro normální, s odstraněnými vaječníky (OVX), falešné a zvířata ošetřené hPTH-(1-31)-NH₂, (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ a (Leu²⁷)cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂.

Obr. 8 ukazuje maximální pokles tlaku krve a čas do maximálního poklesu tlaku krve po přidání dávky 0,8 nmol/ 100 g hPTH-(1-31)-NH₂, (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ a (Leu²⁷)cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂. Peptidy se podávaly buď podkožně (prázdný sloupec), nebo intravenosně (plný sloupec).



- Obr. 9 ukazuje strukturu (Leu²⁷)-hPTH-(1-34)-NH₂ (SEQ ID NO : 5).
- Obr. 10 ukazuje strukturu cyklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 6).
- Obr. 11 ukazuje strukturu (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂ (SEQ ID NO : 7).
- Obr. 12 ukazuje aktivity různých analogů podle tohoto vynálezu při stimulaci adenynylcyklázy.
- Obr. 13 ukazuje hypotenzivní účinek hPTH-(1-31)-NH₂ a hPTH-(1-30)-NH₂ a jejich cyklických analogů.
- Obr. 14 je graf ukazující účinek různých dávek lineárního hPTH-(1-31)-NH₂ na růst kostí.
- Obr. 15 ukazuje strukturu (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-OH (SEQ ID NO : 8).
- Obr. 16 ukazuje strukturu (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-34)-NH₂ (SEQ ID NO : 9).
- Obr. 17 ukazuje strukturu (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-34)-OH₂ (SEQ ID NO : 10).
- Obr. 18 ukazuje strukturu (Ala²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 11).
- Obr. 19 ukazuje strukturu (Nle²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 12).
- Obr. 20 ukazuje strukturu (Nle^{8,28},Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 13).
- Obr. 21 ukazuje strukturu cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 14).
- Obr. 22 ukazuje strukturu (Ile²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 15).
- Obr. 23 ukazuje strukturu (Tyr²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 16).



Obr. 24 ukazuje strukturu α -acetyl-(Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 17).

Obr. 25 ukazuje strukturu (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 18).

Obr. 26 ukazuje strukturu (Leu²⁷)cyklo(Asp²²-Orn²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 19).

Obr. 27 ukazuje strukturu (Cys²², Cys²⁶, Leu²⁷)cyklo(Cys²²-Cys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 20).

Obr. 28 ukazuje strukturu (Cys²⁶, Cys³⁰, Leu²⁷)cyklo(Cys²²-Cys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO : 21).

Příklady provedení vynálezu

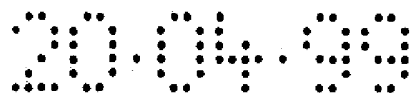
Příprava analogů hormonu

Technika syntézy peptidů v pevné fázi vyvinutá R. B. Merrifieldem ("Solid Phase Synthesis", Advances in Enzymology 32, 221-296, 1969), která je zahrnuta do popisu tímto odkazem, se široce a úspěšně používala při syntéze polypeptidů, jako je paratyroidní hormon. Strategie je založená na připojení karboxylového konce k pevnému nosiči. Pak se přidávají postupně aminokyseliny s vysokým výtěžkem. N-konec α -amino skupiny se tak chrání, takže tato ochranná skupina se může snadno odstranit bez odstranění peptidu z pevného nosiče. Zde použitá chemie vyžaduje modifikaci původního Merrifieldova způsobu, označovanou jako Fmoc přístup. Fmoc skupina (fluorenylmethoxykarbonyl) se může odstranit za mírných alkalických podmínek, což ponechává nedotčené ochranné skupiny bočního řetězce odolné alkáliím a připojení k nosiči. Technika je popsána E. Atherton a R. C. Sheppard, "Solid Phase Synthesis, a Practical Approach", IRL Press, New York, N. Y., což je sem zahrnuto tímto odkazem.

Příklad 1

Syntéza a čištění lineárních analogů hPTH-(1-31)-amidu

α -Amino skupiny aminokyselin se chránily 9-fluorenylmethoxykarbonylem (Fmoc) během spojení. Spojení se provedlo směsí hydroxybenzotriazolem (HOBt), 2-(1H-benzotriazol-



1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluorborátu (TBTU) a diisopropylethylaminu (DIPEA). Použil se 4 násobný přebytek aktivovaných aminokyselin s dvojitým spojením na přidání zbytků Asn, Gln, His, Val a Ile. Doby spojení pro přidání Arg a Gly se zvýšily z 30 na 60 minut. Spojení prvního zbytku (Val³¹) k nosiči (Tentagel* R, Rapp Polymere, Tubingen, Německo) se provádělo ručně. Všechny ostatní kroky se prováděly na automatickém syntetizátoru PerSeptive Biosystems* Model 9050 Plus. Ochrany pobočného řetězce byly postupně: Arg (2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl), Glu, Asp a Ser (t-butyl), His, Gln a Asp (trityl), Trp (t-butylloxykarbonyl).

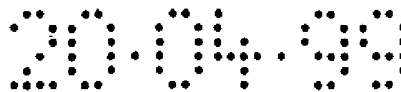
Po odstranění Fmoc z N-koncového Ser se peptidická pryskyřice promyla DCM, pak se štěpila od pryskyřice třepáním s 7,5 ml reagentu K (6,19 ml TFA, po 0,38 ml vody, 90% fenol/vody a thioanisolu, a 0,19 ml 1,2-ethandithiolu po 4 hodiny při 20 °C. Směs odštěpených peptidů se odstranila filtrací a srážela se přidáním t-butyl-methyl etheru. Sraženina se sebrala odstředěním, promyla se dvakrát t-butyl-methyl etherem a pak se sušila vakuovým odstředěním.

Surový produkt se rozpustil v 14 ml 15 % acetonitril/vody, 0,1% TFA a chromatografoval se na koloně Vydac* C₁₈ (0,010 ml, 1 x 25 cm). Produkt se eluoval minimálním 1% gradientem acetonitrilu (14-40%) v 0,1% TFA ve vodě. Čistota konečného produktu se určila analytickou HPLC na koloně Vydac* C₁₈ (0,010 ml, 0,4 x 25 cm) a molekulárním hmotnostním testem na hmotnostním spektrometru s elektrorozprašováním (VG Quattro). Údaje pro takto vzniklý hPTH-(1-31)-NH₂ jsou uvedena v tabulce 1 níže.

Příklad 2

Syntéza a čištění cyklických analogů

(Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂. Tento peptid se syntetizoval, jak se popisuje pro příklad 1 s Lys-Alloc a Glu-OAll substitucemi v poloze 26 a 22. Po přidání Fmoc-Ser¹⁷ se peptidická pryskyřice odstranila z kolony do reakční zkumavky (Minivial*, Applied Science), suspendovala se v 1,7 ml roztoku tetrakis(trifenylfosfin)paladia(0) (0,24 mmol), 5% kyseliny octové a 2,5% N-methylmorfolinu (NMM) v dichlormethanu (DCM) pod argonem, pak se třepala 6 hodin při 20 °C, aby se odstranily allylové a alloc ochranné skupiny (Solé, N. A. aj. (1993) v Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Smith, J. a Hodges, R (Eds), ESCOM, strany 93-94, což je zahrnuto do popisu tímto odkazem. Peptidická pryskyřice se pak promyla 0,5% diethyldithiokarbamátem (DEDT), 0,5% NMM v DMF (50 ml), pak DMF (50 ml) a DCM (50 ml). Peptid se cyklizoval 0,06 mmol 1-hydroxy-7-azabenzotriazolem (HOAt/ 0,12



mmol NMM v DMF (2 ml) 14 hodin při 20 °C (Carpino, L. A. (1993) J. Am. Chem. Soc., 115, 4397-4398. Peptidická pryskyřice se filtrovala, jednou se promyla DMF, znovu se naplnila do kolony a promyla se DMF, dokud se neodstranily bublinky ze suspenze. Zbylá syntéza se prováděla jako v příkladě 1, pouze N-koncová Fmoc skupina se neodstranila. Fmoc peptid se štěpil od pryskyřice reagentem K, jak se popisuje shora. HPLC se prováděla jako v příkladě 1 s Fmoc skupinou neodstraněnou před konečnou HPLC.

Analog (Leu²⁷)cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ se připravil analogickým způsobem.

Příklad 3

Testy adenynylycyklázy

Schopnost analogů hPTH vázat receptory a aktivovat signální mechanismus spojený s adenynylycyklázou se stanovila na diferenciaci buněčné linie kompetentního osteoblastu podobného ROS 17/2 krysím osteosarkomem (ROS). Je známo, že tato aktivita je úzce spojená se schopností analogů obnovit hmotu kostí u krys s odstraněnými vaječníky. Stimulující aktivita na adenynylycyklázu se stanovila nejprve označením buněčné ATP kultury (³H)-adeninem a pak měřením množství (³H)-cyklický AMP vzniklého z (³H)-ATP během prvních 10 minut expozice danému analogu. To je založeno na postupu, jak popisují Whitfield aj., J. Cellular Physiology, 150, 299-303, 1992, což je zahrnuto do popisu tímto odkazem.

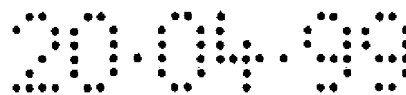
Výsledky s adenynylycyklázou jsou uvedeny v tabulce 2 níže jako koncentrace nutné k vyjádření poloviny maximálního zvýšení AC aktivity. Tyto údaje jsou také uvedeny na obr. 4. Plné kroužky ukazují aktivitu adenynylycyklázy hPTH-(1-31)-NH₂. Aktivity (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ a (Leu²⁷)cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ se ukazují prázdnými a plnými trojúhelníky.

Příklad 4

Stanovení anabolické aktivity hPTH analogů u krys s odstraněnými vaječníky

Dávkování:

Dávky byly založeny na dávkové odpovědi na hPTH-(1-31)-NH₂. Schopnost hPTH-(1-31)-NH₂ budovat kost se testovala s použitím více dávek (0,8, 0,6, 0,4 a 0,2 nmol/ 100 g tělesné hmotnosti) a regenerativním nebo léčením oceňujícím spíše než preventivním modelem¹¹. Krysy s odstraněnými vaječníky staré 3 měsíce se ponechaly 9 týdnů, aby jejich většinou

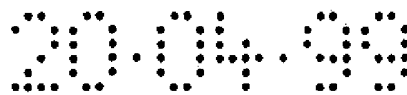


nelamelární, femolární, trabekulární kost byla silně ochuzena před zahájením 6 týdnů denních injekcí. Ke konci 9 týdne ztratily asi 75 % hmotnosti femolární, trabekulární kosti. Obr. 14 ukazuje zvýšení střední trabekulární tloušťky závislé na dávce způsobené lamelárním ukládáním vyvolaným 36 injekcemi 4 různých dávek fragmentu. Fragment by také mohl stimulovat růst trabekulární kosti u mnohem starších krys. Tak 36 injekcí střední dávky lineárního hPTH-(1-31)-NH₂ na růst kostí 0,6 nmol hPTH-(1-31)-NH₂/ 100 g tělesné hmotnosti mohlo významně zvýšit střední trabekulární tloušťku nad normální výchozí hodnotu u krys starých 1 rok a činily to stejně účinně jako hPTH-(1-84). Dávky 0,6 nmol/ 100 g tělesné hmotnosti se tedy použily v dalších testech.

Úplný popis protokolu dávají Rixon, R. H. aj., (1994) *J. Bone Mineral Res.* 9, 1197-1189 a Whitfield aj. (1996) *Calcified Tissue Int.* 58, 81-87, což je zahrnuto do popisu tímto odkazem. Normální Sham-OVX (s odstraněnými vaječníky) a OVX Sprague-Dawley krysy (staré 3 měsíce 255-260 g) se získaly z Charles River Laboratories (St. Constant, QC). Krysy se náhodně rozdělily do skupin po 8 zvířatech, které dostávaly krysí stravu Purina a vodu podle libosti. Nedošlo k žádným neplánovitým úmrtím. Zvířata dostala jednou denně 6 podkožních injekcí za týden počínaje od konce druhého týdnu po OVX a konče na konci osmého týdne po OVX (například 36 injekcí). Osm Sham-OVX a osm OVX kontrolních krys dostalo 36 injekcí vehikula (0,15M NaCl obsahující 0,001N HCl), zatímco osm OVX krys dostalo 0,6 nmol/ 100 g tělesné hmotnosti fragmentu ve vehikulu/ 100 g tělesné hmotnosti. Na konci osmého týdne po OVX se femury vyjmuly, isolovaly, čistily a rozřízly na polovinu u střední diaphysis a proximální půle se vyhodila. Po odstranění epifýzy se každá půle femuru podélně rozštěpila na dvě části a kostní morek se vypláchl.

Schopnosti fragmentů tvořit kost se hodnotily podle změn průměrné tloušťky (plocha/obvod) trabekulí v distální polovině femuru u různě ošetřených zvířat. Aby se změřila průměrná tloušťka trabekulí, dvě demineralizované poloviny femuru od každé krysy se dehydrovaly a zalily se do parafinu. Podélné 0,010 mm sekce ze střední roviny každé kosti se vyřízly a obarvily se Sandersonovým rychlým barvivem kostí (Surgipath Medical Industries, Inc., Winnipeg, MB, Kanada). Průměrná tloušťka trabekulí se změřila s použitím zobrazovací soustavy M4 a kostního morfometrického software od Imaging Research, Inc., St. Catherines, On, Kanada).

Reprezentativní histologické řezy kostí připravené na konci osmého týdne po OVX se ukazují na obr. 5. Výsledky se dále ukazují ve formě sloupcového grafu na obr. 7. Sloupce ukazují hodnoty tloušťky trabekulí u normálních krys, krys s odstraněnými vaječníky (OVX),



falešných, hPTH-(1-31)-NH₂, (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ a (Leu²⁷)cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂. (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ ukazuje zvlášt' výbornou aktivitu ve srovnání s lineárním analogem hPTH-(1-31)-NH₂. Tento lineární analog se ukázal být zcela aktivní při obnově kosti, ale užívá jen cestu buněčné signalizace (AC-aktivace). Tedy se očekává, že cyklické analogy podobně jako jejich lineární analogy mají méně nežádoucích postranních klinických účinků než jejich delší vzory jako hPTH-(1-34) nebo hPTH-(1-84).

Příklad 5

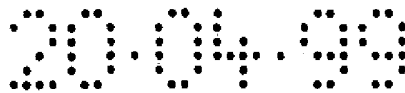
Obnova kosti analogy hPTH u krys se silně zbavenou trabekulární kostí

V tomto druhém příkladu obnovy kosti se srovnávají schopnosti fragmentů obnovit silně zbavenou trabekulární kost. V tomto pokusu se 6. týdenní program injekcí jednou denně 0,6 nmol peptidu/ 100 g tělesné hmotnosti u mladých sexuálně zralých krys se odložil až na konec 9. týdne po OVX. V této době se ztratilo 75 % jejich trabekulárních kostí, jak lze vidět na obr. 6, nejúčinnější z fragmentů byl (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂, který obnovil kosti na hodnoty normálních kontrolních krys.

Příklad 6

Hypotenzivní účinky analogů hPTH

Samičí Sprague-Dawley krysy (vážíci přes 290 g) se anestetikovaly intraperitoneálně injikovaným pentobarbitalem sodným (65 mg/ kg tělesné hmotnosti). Monitorovala se rektální teplota termistorem YSI402 (Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH) a udržovala se mezi 36,0 a 38,5 °C během pokusu. Také se monitorovala teplota ušního boltce s použitím termistoru YSI banjo. Ocasní artérie se obnažila a kanulovala se Jelco 25-gIV katetrem (Johnson and Johnson Medical Inc., Arlington, TX) a připojila se k Stanthamovu převodníku tlaku, jehož signály se digitálně zapisovaly monitorem Biopac Systems MP100 (Harvard Instruments, Saint Laurent, QC, Kanada). Také se obnažila femorální žíla pro intravenosní injekci PTH nebo jednoho jeho fragmentů. Po operaci se krysy nechaly 8 minut stabilizovat. Potom se PTH nebo jeden z jeho fragmentů (rozpuštěný v okyselené solance obsahující 0,001N HCl) se injikovaly do femorální žíly nebo pod kůži zadku. Údaje se sbíraly 12 minut po intravenosní injekci nebo 22 minut po podkožní injekci. Obr. 8 ukazuje maximální pokles tlaku krve a čas do maximálního poklesu tlaku krve po přidání dávky 0,8 nmol hPTH-(1-31)-NH₂/ 100 g tělesné hmotnosti, (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ a (Leu²⁷)cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-



hPTH-(1-31)-NH₂. Podávalo se buď podkožně (prázdný sloupec), nebo intravenosně (plný sloupec). (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ analog ukazuje zvýšenou biodostupnost ve srovnání s (Leu²⁷)cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂. To naznačuje mnohem kratší doba potřebná k poklesu tlaku krve na minimum po podkožní injekci. Oba cyklické analogy ukazují zvýšené hypotenzivní účinky, když se injikují podkožně ve srovnání s hPTH-(1-31)-NH₂. Tedy se očekává, že každý cyklický laktamový analog, když se injikuje podkožně, bude mít více žádoucích vlastností než lineární obdoba. Ty zahrnují zvýšenou biodostupnost pro transport z lipidických okolí. Toto by mohlo být důsledkem stabilizace α-šroubovnice blízko C-konce hormonu.

Další výsledky:

Pro účely těchto výsledků se peptidy identifikují následovně:

hPTH-(1-31)-NH₂ (1),

(Leu²⁷)-hPTH-(1-31)-NH₂ (2),

(Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (3) (obr. 2),

(Leu²⁷)cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (4),

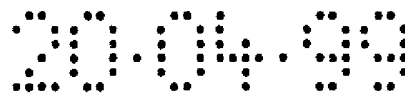
cyklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (5) (obr. 10),

(Leu²⁷)-hPTH-(1-30)-NH₂ (7),

(Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂ (8).

Aktivita adenylcyklázy. Dříve jsme uvedli, že (Leu²⁷)-hPTH-(1-34)-NH₂ je účinnější při stimulaci AC aktivity v ROS buněčné linii než hPTH-(1-34)-NH₂.

⁵ Také jsme zjistili, že peptid (2) (EC₅₀ 11,5 +/- 5,2 nmol) je aktivnější než nativní sekvence (1), (EC₅₀ 19,9 +/- 3,9 nmol) (obr. 12). Jsou ukázané peptidy 1 (●), 2 (□), 3 (Δ), 4 (▲), 5 (○). Vznik laktamu mezi Glu²² a Lys²⁶ indukovalo ještě větší AC- stimulující aktivitu s EC₅₀ hodnotami 3,3 +/- 0,3 nmol) (obr. 12). Tedy zesilující vliv cyklizace a náhrada Lys²⁷ za Leu vede k asi 6-násobné zvýšení aktivity. Naproti tomu vznik laktamu jak mezi Lys²⁶ a Asp³⁰ (4) tak mezi Lys²⁷ a Asp³⁰ (5) vedlo ke snížení stimulace aktivity adenylcyklázy vzhledem k jejich výchozím lineárním sekvencím. Tak 26-30 laktam (4) má trochu menší aktivitu než jeho



lineární forma s EC_{50} 17,0 +/- 3,3 nmol proti 11,5 +/- 5,2 nmol pro (2). 27-30 laktam (5) snižuje aktivitu výchozího lineárního peptidu. Má EC_{50} 40,3 +/- 4,4 nmol ve srovnání s 19 +/- 3,9 nmol pro (1).

Dříve jsme uvedli, že hPTH-(1-30)-NH₂ (6) má stimulační AC-aktivitu (EC_{50} 20 nmol), blízkou analogu (1). Nyní jsme našli, že (Leu²⁷)-hPTH-(1-30)-NH₂ (7) a (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂ (8) (obr. 11) mají stimulační AC-aktivity podobné peptidu (6).

Hypotenzivní účinky:

Obrázek 13 ukazuje hypotenzivní účinek lineárních (6 a 7) a cyklických analogů (3 a 8). Ukazují se maximální poklesy (horního) tlaku krve získané po injekci krysám 0,8 nmol analogu/ 100 g tělesné hmotnosti a čas do dosažení maximálního poklesu tlaku krve (nižší). Analogy (od leva do prava peptidy 8, 7, 6, 3) se injikovaly buď intravenosně (stínovaný sloupec) nebo podkožně (prázdný sloupec). Odstranění Val³¹ vedlo u všech analogů 6, 7 a 8 k významnému ($p < 0,05$) snížení rychlosti přenosu podkožně injikovaných peptidů do vaskulárního systému (obr. 13). Skutečné celkové poklesy tlaku krve u peptidů 6 a 8 se nicméně významně ($p > 0,05$) nelišily od poklesů u jiných analogů, ať se podávaly podkožně nebo intravenosně, s výjimkou peptidu 5.

Pokus srovnávající hypotenzivní účinek s osteogenní aktivitou

Jak se popisuje v příkladě 6 a ukazuje se na obr. 8, rychlý hypotenzivní účinek pozorovaný po podkožní injekci hPTH analogů koreluje s osteogenní aktivitou. Proto je užitečný pokus pro screening kandidátních hPTH analogů pro osteogenní účinek a aby se vyloučily nehypotenzivní konstrukty, aniž by se musela obětovat laboratorní testovací zvířata.

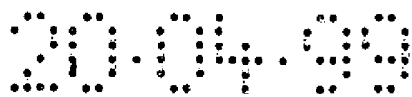
Pro pozadí, použili jsme jediný soubor osteogenních a neosteogenních AC-, AC/PLC- nebo PLC-aktivujících fragmentů, aby se definitivně dokázalo, že je to pouze AC-stimulace, která snižuje tlak krve, a porovnali se hypotenzivní účinky těchto fragmentů, když se injikují podkožně nebo intravenosně krysím samicím. Ukázali jsme, že hypotenzivní odpověď se spouští pouze fragmenty stimulačnými AC-, AC/PLC- nebo PLC- a že je to relativně slabá odpověď na podkožní injekci a nikoliv mnohem větší odpověď na intravenosní injekci, která koreluje s osteogenními aktivitami hPTH-(1-31)-NH₂, hPTH-(1-34) a hPTH-(1-84) u OVX krys, nikoliv však k hPTH-(1-30)-NH₂, která stimuluje AC a snižuje tlak krve, ale nestimuluje růst kostí.

Podrobněji, hPTH-(1-84) a její fragmenty hPTH-(1-34), hPTH-(1-31)-NH₂ a hPTH-(1-30)-NH₂ snižovaly tlak krve v ocasní arterii samičích Sprague-Dawley krys o 42,7-67,1 % asi během 1 minuty po injekci do femorální žily, ale snižovaly tlak krve jen o 8,5-36,2 % 2-19 minut po podkožní injekci. hPTH-(1-84) a hPTH-(1-34) stimulují v cílových buňkách jak adenynylyklázu, tak fosfolipázu-C, avšak hypotenzivní účinky musely být stimulovány specificky aktivací adenynylyklázy, protože hPTH-(1-30)-NH₂ a hPTH-(1-31)-NH₂, které mohou stimulovat pouze adenynylyklázu, byly silně hypotenzivní, když se injikovaly intravenosně, zatímco hPTH-(1-84), která stimuluje pouze fosfolipázu-C, nebyla silně hypotenzivní, když se injikovala intravenosně. Poněvadž osteogenní účinek PTH je také zprostředkován stimulací adenynylyklázy, očekávalo se, že hypotenzivní odpověď by se mohla využít pro screening nových PTH konstruktů na možnou osteogenicitu. Osteogenní aktivity podkožně injikovaných hPTH-(1-31)-NH₂, hPTH-(1-34) a hPTH-(1-84) blízko korelovaly s jejich hypotenzivními aktivitami. hPTH-(1-34) byl o hodně více hypotenzivní a významně více než ostatní dvě molekuly. hPTH-(1-31)-NH₂ a hPTH-(1-84) byly stejně osteogenní a hypotenzivní. Avšak tato korelace selhala u hPTH-(1-30)-NH₂, která stimuluje AC skoro tak silně jako hPTH-(1-31)-NH₂ a hPTH-(1-34) a snižuje tlak krve jako hPTH-(1-31)-NH₂, ale nestimuluje růst kostí. Nicméně schopnost významně snižovat tepenný tlak je obecnou vlastností osteogenní PTH a PTH fragmentů a je tedy rychle stanovitelným předběžným ukazatelem bioaktivity in vivo PTH fragmentů.

Podrobněji, jak hPTH-(1-34) tak hPTH-(1-31)-NH₂ byly maximálně hypotenzivní při 0,8 nmol/ 100 g tělesné hmotnosti. Tato hypotenzivní odpověď byla doprovázena přechodným (20-30 minut) zčervenáním krysích uší a tlapek, což lze považovat za užitečný vizuální kvalitativní znak.

Ačkoliv AC- nebo AC/PLC- stimulující fragmenty byly silně hypotenzivní, když se injikovaly intravenosně, intravenosní injekce 0,8 nmol hPTH-(1-84) / 100 g tělesné hmotnosti, která může stimulovat pouze PLC velmi pomalu (9,8 +/- 2,0 minut) a pouze velmi lehce, snižovala tlak v ocasní tepně o 0,44 +/- 0,13 kPa v porovnání s rychlým (0,9 +/- 0,08 minut) snížením 5,76 +/- 0,77 kPa způsobeným AC/PLC- stimulující hPTH-(1-84) nebo stejně rychlým poklesem 6,88 +/- 0,44 způsobeným AC stimulující hPTH-(1-30)-NH₂.

Jedna podkožní injekce AC- nebo AC/PLC- stimulujícího fragmentu způsobila mnohem pomalejší a menší snížení tlaku v ocasní tepně než intravenosní injekce stejné dávky. Například 0,8 nmol hPTH-(1-34) / 100 g tělesné hmotnosti snižovala tlak v ocasní tepně o 3,72



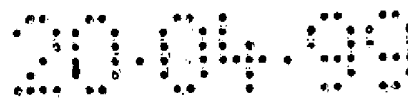
+/- 0,48 kPa, když se injikovala podkožně v porovnání s 6,79 +/- 0,75 kPa, když se injikovala intravenosně. Stejná dávka hPTH-(1-30)-NH₂ snižovala tlak krve jen o 1,48 +/- 0,21 kPa, když se injikovala podkožně, v porovnání s 6,88 +/- 0,44 kPa, když se injikovala intravenosně.

Neexistoval významný rozdíl mezi rychlým a velkým poklesem tlaku v ocasní tepně způsobeného intravenosní injekcí hPTH-(1-84), hPTH-(1-34) a hPTH-(1-31)-NH₂, avšak hPTH-(1-34) byl alespoň dvakrát tak účinný ($p < 0,001$) jako ostatní dvě molekuly, když se injikovaly podkožně.

Jedním z faktorů ovlivňujících hypotenzivní aktivitu a osteogenicitu podkožně injikovaných PTH nebo PTH fragmentů je schopnost se pohybovat bez dezaktivace z místa injekce ke svému cíli nejprve do svalstva a pak do kostí. Tato schopnost se odráží v době potřebné pro tlak v ocasní tepně klesnout na minimální hodnotu po injekci. Zkrácení PTH molekuly na C-konci z 84 na 31 zbytků odstranilo schopnost stimulovat PLC bez snížení schopnosti stimulovat AC a snížilo devětkrát množství času potřebného pro tlak v ocasní tepně, aby dosáhl svého minima. Odstranění jednoho zbytku, aby vznikl hPTH-(1-30)-NH₂, dramaticky zvýšilo množství času potřebného pro tlak v ocasní tepně, aby spadl na své minimum z 2,0 +/- 0,31 minut v případě hPTH-(1-31)-NH₂ na 13,8 +/- 2,3 minut. Je však důležité poznamenat, že hPTH-(1-31)-NH₂ trvalo déle snížit tlak krve než hPTH-(1-84).

Použití v této studii hPTH-(1-31)-NH₂, prvního PTH konstruktů schopného stimulovat AC stejně silně jako hPTH-(1-31) bez aktivace PLC a stimulujícího aktivitu PKC spojenou s membránou, nyní dalo nejpřímější důkaz, že hypotenzivní účinek PTH je způsoben úplně AC aktivací. Tedy ačkoliv intravenosní injekce 0,8 nmol hPTH-(7-84) / 100 g tělesné hmotnosti, která může pouze stimulovat PLC/PKC, neovlivnila významně tlak v ocasní tepně, intravenosní injekce stejné dávky hPTH-(1-30)-NH₂ snížila tlak stejně jako hPTH-(1-34).

Protože AC také zprostředkovává PTH indukovanou stimulaci kortikální a trabekulární tvorby kostí u OVX krys, spuštění hypotenzivní odpovědi u nedotčených krysích samic se zdá být jednoduchým, snadno měřitelným ukazatelem možné osteogenicity PTH konstruktů. Na druhé straně selhání při snižování arteriálního tlaku by vyloučilo fragment z dalšího vyhodnocování, tedy vyřazujícím zbytečné, nákladné dlouhodobé testy osteogenicity OVX krys. Hypotenzivní odpovědi na intravenosní injekce PTH by nebyly korelovány s osteogenicitami. Avšak mnohem menší hypotenzivní odpovědi na podkožní injekce hPTH-(1-31)-NH₂, hPTH-(1-34) a hPTH-(1-84) byly paralelní k osteogenicitám těchto molekul s hPTH-(1-34) majícím nejsilnější hypotenzivní a osteogenní aktivitu a druhé dvě molekuly vzájemně stejně účinné,



ale méně účinně než hPTH-(1-34) při snižování tlaku krve a stimulaci tvorby kostí. Avšak tato korelace selhala u hPTH-(1-30)-NH₂, která stimuluje AC skoro tak silně jako hPTH-(1-31)-NH₂ a hPTH-(1-34) a snižuje tlak krve jako hPTH-(1-31)-NH₂, ale nestimuluje růst kostí¹¹. Důvod tohoto nedostatku osteogenicity není znám. Nemůže být působen pouze podkožně injikovaným hPTH-(1-30)-NH₂, potřebujícím více času na snížení tlaku krve, protože podkožně injikovaný hPTH-(1-84) potřebuje stejné množství času na snížení tlaku krve, avšak je silně osteogenní. Osteogenní odpověď jasně závisí na řadě různých faktorů, které se kombinují, aby umožnil přístup z místa injekce dosti aktivního hormonu nebo fragmentu hormonu na cílové zralé osteoblasty exprimující PTH receptor. Neschopnost hPTH-(1-30)-NH₂, AC- stimuluje tlak krve, stimulovat tvorbu kostí by mohla být výsledkem větší nestability, poněkud vyšší EC₅₀ pro AC stimulaci, například 20 nmol místo 16 nmol pro hPTH-(1-31)-NH₂ a hPTH-(1-34), a dlouhé doby pro vstup do cirkulace z místa injekce.

Přes neschopnost hPTH-(1-30)-NH₂ být osteogenní, schopnost významně snižovat tepenný tlak je stále obecnou vlastností osteogenních PTH a je tedy rychle stanovitelným ukazatelem možné bioaktivity in vivo PTH fragmentů. Z toho plyne, že hypotenzivní odpověď by také měla sloužit jako účinný ukazatel schopnosti osteogenního PTH konstruktu dosáhnout své cíle po podání orální nebo jinou neinjekční cestou.

Nepohodlí a jiné možné nepříjemnosti hypotenzivní reakce na každou injekci by mohly snížit vůli pacientů s osteoporózou přijímat dlouhodobé léčení s PTH a PTH fragmenty. Naštěstí se přerušované podkožní injekce se běžně užívají k stimulaci tvorby kostí a tyto molekuly jsou mnohem méně hypotenzivní, když se injikují podkožně, než když se injikují intravenózně. Jak jsme také argumentovali dříve^{6,7} hPTH-(1-30)-NH₂ by také měl další výhodu stimulace AC bez stimulace PLC a kterýchkoliv možných postranních účinků působených Ca²⁺ a PKC, které by mohl spustit.

Příklad 7

Cyklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (5). Syntéza se provedla analogickým způsobem k (Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂. Produkt měl odhadnutou čistotu přes 95 % s molekulovou hmotností 3700,64 (+/-0,38) (očekávaná M + 1 = 3700,14). Peptid se sekvenoval, aby se potvrdila poloha laktamu.

(Leu²⁷)cyklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂. Tento peptid se připravil jako peptid (3) bez ručního přidávání Val na nosič. Produkt měl odhadnutou čistotu přes 97 % s molekulovou hmotností 3586,14 (+/-0,19) (očekávaná M + 1 = 3685,99).

Analogy podle vynálezu se mohou podávat teplokrevnému savci, který to potřebuje, zejména lidem, parenterálně, topicky, rektálně, inhalací nebo ústně. Analogy se mohou konvenčně upravit do parenterální dávkové formy, smícháním asi 1 do asi 300 mg na jednotkovou dávkovou formu s konvenčním vehikulem, excipientem, pojivem, konzervačním činidlem, stabilizátorem, barvivem, a podobně, jak je běžné u přijaté farmaceutické praxe.

Pro parenterální podávání by bylo potřeba dávat 1 až 2 ml bezbolestné podkožní injekce velmi jemnou injekční jehlou 30-guage více než jednou denně po jeden až dva roky, v závislosti na závažnosti choroby. Injikovaný materiál by obsahoval jednu sloučeninu podle vynálezu ve vodném, isotonickém sterilním roztoku nebo suspenzi (případně s konzervačním činidlem, jako je fenol, a solubilizátorem, jako je ethylendiamin tetraoctová kyselina (EDTA)). Mezi přijatelnými vehikuly a rozpouštědly, které se mohou použít jsou voda, mírně okyselená voda, Ringerův roztok a isotonický roztok chloridu sodného. Mimoto se konvenčně používají jako rozpouštědla nebo suspendující media sterilní fixované oleje. Při přípravě injekcí jako fixované oleje nacházejí použití syntetické monoglyceridy, diglyceridy, mastné kyseliny (jako kyselina olejová).

Pro rektální podávání lze analogy podle vynálezu připravit ve formě čípků smícháním s vhodným nedráždivým excipientem, jako je kakaové máslo nebo polyethylenglykoly.

Pro topické použití lze analogy podle vynálezu připravit ve formě mastí, gelů, roztoků, suspenzí nebo kožních adhesivních náplastí.

Inhalace lze například dosáhnout prostředky popsány v PCT publikované přihlášce WO 94/07514. Denní dávka by neměla překročit 0,05 mg/ kg tělesné hmotnosti, nebo asi 3,5 mg/ 70 kg člověka v závislosti na aktivitě dané sloučeniny, věku, hmotnosti, pohlaví a podmínkách léčeného subjektu. Jak je dobře známo, množství aktivní složky, která se může kombinovat s nosiči, aby se dostala jednotková dávka, se bude měnit v závislosti na hostiteli a daném způsobu podávání.

Následující tabelovaný soupis analogů připravených podle postupů popsaných shora.

Tabulka 1: Molekulové hmotnosti PTH analogů

sekv. ID	analog	hmotnost (stanovená)	hmotnost (očekávaná) M·l
1	hPTH-(1-31)-NH ₂	3717,77 (±0,13)	3717,14
3	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3685,46 (±0,46)	3685,12
7	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-30)-NH ₂	3586,14 (±0,19)	3585,99
4	[Leu ²⁷]cyclo(Lys ²⁶ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3685,61 (±0,36)	3685,12
6	cyclo(Lys ²⁷ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3700,64 (±0,38)	3700,14
8	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-OH	3685,96 (±0,07)	3686,12
9	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-NH ₂	4083,62 (±0,33)	4083,52
10	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-OH	4084,14 (±0,87)	4084,52
11	[Ala ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3642,70 (±0,76)	3643,04
12	[Nle ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684,57 (±0,99)	3685,12
13	[Nle ^{8,18} ;Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3649,50 (0,59)	3649,04
14	cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3699,66 (±0,49)	3700,14
15	[Ile ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684,76 (±0,74)	3685,12

Tabulka 1 Molekulové hmotnosti PTH analogů

sekv. ID	analog	hmotnost (stanovená)	hmotnost (očekávaná)M+1
16	[Tyr ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3734,47 (±0,80)	3735,14
17	α-acetyl-[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3726,25 (±0,42)	3727,12
18	[Leu ²⁷]cyclo(Lys ²² -Glu ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684,67 (±0,52)	3685,12
19	[Leu ²⁷]cyclo(Asp ²² -Orn ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3656,90 (±0,67)	3657,12
20	[Cys ²² ;Cys ²⁶ ;Leu ²⁷]cyclo(Cys ²² -Cys ²⁶)hPTH(1-31)NH ₂	3651,26 ±0,31	3650,1
21	[Cys ²⁶ ;Cys ³⁰ ;Leu ²⁷]cyclo(Cys ²⁶ -Cys ³⁰)hPTH(1-31)NH ₂	3663,61 ±0,16	3664,13

Tabulka 2 Adeninylycyklázové aktivity peptidových analogů

sekv. ID	analog	adenylycykláza (EC ₅₀)
1	hPTH-(1-31)-NH ₂	20
3	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3
7	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-30)-NH ₂	20
4	[Leu ²⁷]cyclo(Lys ²⁶ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3*, 17**
6	cyclo(Lys ²⁷ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	40
8	Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-OH	7
9	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-NH ₂	8
10	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-OH	6
11	[Ala ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
12	[Nle ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
13	[Nle ^{9,16} ;Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	6
14	cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	17
15	[Ile ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9

Tabulka 2 Adenylylcyklázové aktivity peptidových analogů

sekv. ID	analog	adenylylcykláza (EC ₅₀)
16	[Tyr ⁴¹]cyclo(Glu ⁴² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
17	α-acetyl-[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	24
18	[Leu ²⁷]cyclo(Lys ²² -Glu ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	4
19	[Leu ²⁷]cyclo(Asp ²² -Orn ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	>200
20	[Cys ²² ;Cys ²⁶ ;Leu ²⁷]cyclo(Cys ²² -Cys ²⁶)hPTH(1-31)NH ₂	16
21	[Cys ²⁶ ;Cys ³⁰ ;Leu ²⁷]cyclo(Cys ²⁶ -Cys ³⁰)hPTH(1-31)NH ₂	24

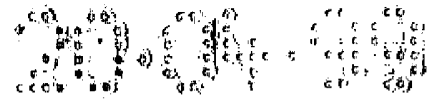
* obr. 4

** obr. 12

Literatura

Obsah následujících publikací je sem zahrnut tímto odkazem.

- (1) Caulfield, M. P.; McKee, R. L.; Goldman, M. E.; Duong, L. T.; Fisher, J. E.; Gay, C. T.; DeHaven, P. A.; Levy, J. J.; Roubini, E.; Nutt, R. F.; Chorev, M.; Rosenblatt, M. The Bovine Renal Parathyroid Hormone(PTH) Receptor Has Equal Affinity for 2 Different Amino Acid Sequences - The Receptor Binding Domains of PTH and PTH-Related Protein Are Located Within the 14-34 Region. *Endocrinology* 1990, 127, 83-87.
- (2) Neugebauer, W.; Barbier, J.-R.; Sung, W.L.; Whitfield, J.F.; Willick, G.E. Solution Structure and Adenylyl Cyclase Stimulating Activities of C-Terminal Truncated Human Parathyroid Hormone Analogues *Biochemistry* 1995, 34, 8835-8842.
- (3) Gardella, T. J.; Wilson, A. K.; Keutmann, H. T.; Oberstein, R.; Potts, J. T.; Kronenberg, H.M., and Nussbaum, S. R. Analysis of Parathyroid Hormone's Principal Receptor-Binding Region by Site-Directed Mutagenesis and Analog Design. *Endocrinology* 1993, 132, 2024-2030.
- (4) Marqusee, S.; Baldwin, R.L. Helix Stabilization by Glu ...Lys+ Salt Bridges in Short Peptides of *De Novo* Design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987, 84,8898-8902.



- (5) Surewicz, W.K.; Neugebauer, W.; Gagnon, L.; MacLean, S.; Whitfield, J.F.; Willick, G.E. Structure-Function Relationships in Human Parathyroid Hormone: The Essential Role of Amphiphilic-Helix. In *Peptides: Chemistry, Structure, and Biology* 1993; Smith, J.; Hodges, R., Eds.; ESCOM Leiden, The Netherlands, 1993, pp. 556-558
- (6) Whitfield, J. F.; Morley, P.; Willick, G. E.; Ross, V.; Barbier, J. R.; Isaacs, R. J.; Ohannessianbarry, L. Stimulation of the Growth of Femoral Trabecular Bone in Ovariectomized Rats by the Novel Parathyroid Hormone Fragment, hPTH-(1-31)NH₂ (Ostabolin) *Calcif. Tissue Int.* 1996, 58, 81-87.
- (7) Whitfield, J. F.; Morley, P. Small Bone-Building Fragments of Parathyroid Hormone: New Therapeutic Agents for Osteoporosis *Trends Pharmacol. Sci.* 1995 16, 382-386.

Seznam sekvencí

(2) Informace o řetězci SEQ ID NO : 1:

Charakteristika řetězce:

(i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 1: *

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1 5 10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu

15 20 25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 2:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO:2:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1 5 10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu

15 20 25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 3:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 3:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1 5 10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu

15 20 25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 4:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 4:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
 1 5 10
 Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu
 15 20 25
 Gln Asp Val
 30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 5:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 5:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
 1 5 10
 Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu
 15 20 25
 Gln Asp Val
 30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 6:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 6:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
 1 5 10

20.04.09

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu

15

20

25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 7:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 30 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 7:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1

5

10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu

15

20

25

Gln Asp

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 8:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 8:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1

5

10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu

15

20

25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 9:

Charakteristika řetězce:

- i) A) Délka: 34 aminokyselin,
- B) Typ: aminokyselina,
- D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 9:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
 1 5 10
 Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu
 15 20 25
 Gln Asp Val His Asn Phe
 30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 10:

Charakteristika řetězce:

- i) A) Délka: 34 aminokyselin,
- B) Typ: aminokyselina,
- D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

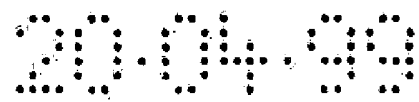
(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 10:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
 1 5 10
 Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu
 15 20 25
 Gln Asp Val His Asn Phe
 30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 11:

Charakteristika řetězce:

- i) A) Délka: 31 aminokyselin,
- B) Typ: aminokyselina,



D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 11:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1 5 10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Ala Leu

15 20 25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 12:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 12:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1 5 10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Xaa Leu

15 20 25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 13:

Charakteristika řetězce:

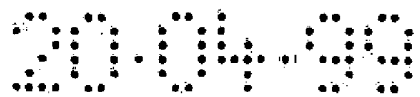
i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 13:



Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 16:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 16:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1 5 10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Tyr Leu

15 20 25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 17:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 17:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1 5 10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu

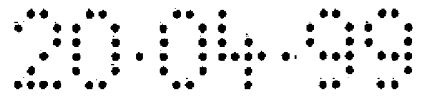
15 20 25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 18:

Charakteristika řetězce:



i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 18:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1 5 10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Glu Leu Leu

15 20 25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 19:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 19:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His

1 5 10

Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Xaa Leu Leu

15 20 25

Gln Asp Val

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 20:

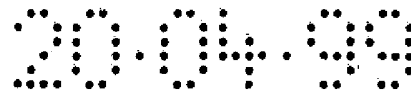
Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,



(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 20:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
 1 5 10
 Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Cys Leu Leu
 15 20 25
 Gln Asp Val
 30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 21:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: cirkulární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 21:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
 1 5 10
 Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Cys Leu Leu
 15 20 25
 Gln Cys Val
 30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 22:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 34 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 22:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
 1 5 10
 Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu
 15 20 25



Gln Asp Val His Asn Phe

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 23:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 31 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: protein,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 23:

Xaa Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys Xaa

1

5

10

Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Arg Val Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Leu

15

20

25

Xaa Asp Xaa

30

Informace o řetězci SEQ ID NO : 24:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 4 aminokyseliny,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 24:

Val His Asn Xaa

1

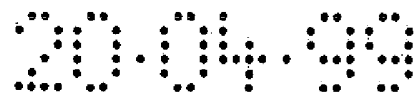
Informace o řetězci SEQ ID NO : 25:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 5 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,



(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 25:

Val His Asn Phe Xaa

1

5

Informace o řetězci SEQ ID NO : 26:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 6 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 26:

Val His Asn Phe Val Xaa

1

5

Informace o řetězci SEQ ID NO : 27:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 7 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 27:

Val His Asn Phe Val Ala Xaa

1

5

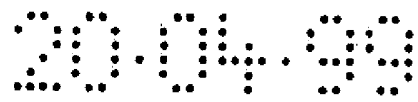
Informace o řetězci SEQ ID NO : 28:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 8 aminokyselin,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,



(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 28:

Val His Asn Phe Val Ala Leu Xaa

1

5

Informace o řetězci SEQ ID NO : 29:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 4 aminokyseliny,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 29:

His Lys Lys Lys

1

Informace o řetězci SEQ ID NO : 30:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 4 aminokyseliny,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 30:

His Leu Lys Lys

1

Informace o řetězci SEQ ID NO : 31:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 4 aminokyseliny,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 31:

Lys Lys Lys Lys

1

Informace o řetězci SEQ ID NO : 32:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 4 aminokyseliny,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 32:

His Leu Lys Ser

1

Informace o řetězci SEQ ID NO : 33:

Charakteristika řetězce:

i) A) Délka: 5 aminokyseliny,

B) Typ: aminokyselina,

D) Topologie: lineární,

(ii) Typ molekuly: peptid,

(xi) Popis řetězce : SEQ ID NO: 33:

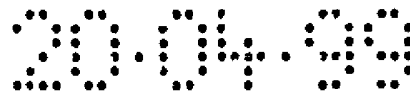
Val Leu Asn Phe Xaa

1

5

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Analog lidského paratyroidního hormonu hPTH-(1-31) v jehož poloze 27 je Lys nebo byl substituován vhodným hydrofobním zbytkem a který byl cyklizován, aby vznikl laktam.
2. Analog podle nároku 1, kde cyklizace je buď mezi Glu²² a Lys²⁶ nebo mezi Lys²⁶ a Asp³⁰.
3. Analog podle nároku 1, kde hydrofobní zbytek je Leu.
4. Analog podle nároku 1, kde hydrofobní zbytek je vybrán ze skupiny sestávající z ornithinu, citrulinu, kyseliny α -aminomáselné, nebo jakéhokoliv lineární nebo rozvětvené α -amino alifatické kyseliny mající 2 až 10 uhlíků v postranním řetězci, jakéhokoliv takového analogu majícího polární nebo nabitou skupinu na konci alifatického řetězce.
5. Analog podle nároku 4, kde hydrofobní zbytek je vybrán ze skupiny sestávající z Ile, norleucinem, Met a ornithinem.
6. Analog podle nároku 1, kde má buď C-koncové amidové zakončení, nebo C-koncové karboxylové zakončení.
7. Analog podle nároku 1, kde je to SEQ ID NO: 3.
8. Analog podle nároku 1, kde je to SEQ ID NO: 4.
9. Kompozice pro podávání teplokrevnému zvířeti, které to potřebuje, obsahující analog lidského paratyroidního hormonu hPTH-(1-31) podle nároku 1 ve spojení s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo excipientem.
10. Kompozice podle nároku 9, kde hydrofobní zbytek v analogu je Leu.
11. Kompozice podle nároku 9, kde hydrofobní zbytek v analogu je vybrán ze skupiny sestávající z Ile, norleucinu, Met a ornithinu.
12. Kompozice podle nároku 9, kde analogem je SEQ ID NO: 3.
13. Kompozice podle nároku 9, kde analogem je SEQ ID NO: 4.
14. Způsob léčení teplokrevného zvířete, které takové léčení potřebuje, zahrnující podávání takovému teplokrevnému zvířeti terapeuticky účinné množství analogu lidského paratyroidního hormonu hPTH-(1-31) podle nároku 1.



15. Způsob podle nároku 14, kde hydrofobní zbytek v analogu je Leu.
16. Způsob podle nároku 14, kde hydrofobní zbytek v analogu je vybrán ze skupiny sestávající z Ile, norleucinu, Met a ornithinu.
17. Způsob podle nároku 14, kde analogem je SEQ ID NO: 3.
18. Způsob podle nároku 14, kde že analogem je SEQ ID NO: 4.
19. Lidský paratyroidní hormon hPTH a jeho farmaceuticky přijatelné soli mající řetězec aminokyselin:

R-NH-R1-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-R2-His Asn-Leu-Gly-Lys-R3-R4-R5-R6-R7-Glu-Arg-Val-R8-Trp-Leu-R9-R10-R11-Leu-R12-Asp-Y

kde

R = vodík nebo jakákoliv lineární nebo rozvětvená alkylová, acylová nebo arylová skupina,

R1 = Ser, Ala nebo Aib,

R2 = Met nebo přirozeně se vyskytující hydrofobní aminokyselina,

R3 = His nebo ve vodě rozpustná aminokyselina,

R4 = Leu nebo ve vodě rozpustná aminokyselina,

R5 = Asn nebo ve vodě rozpustná aminokyselina,

R6 = Ser nebo ve vodě rozpustná aminokyselina,

R7 = Met nebo přirozeně se vyskytující hydrofobní aminokyselina,

R8 = Glu, Lys nebo Asp,

R9 = Cys, Glu nebo Orn,

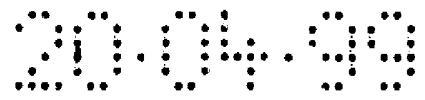
R10 = Arg, Lys, Orn, Gln, Glu nebo Asp,

R11 = přirozeně se vyskytující hydrofobní nebo polární aminokyselina,

R12 = Gln, Arg, Glu, Asp, Lys nebo Orn,

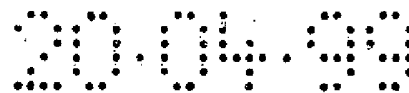
X = OH, NH₂ a

Y = X, Val-X, Val-His-X, Val-His-Asn-X, Val-His-Asn-Phe-X, Val-His-Asn-Phe-Val-X, Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-X, Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu-X, cyklizované jako mezi jedním nebo dvěma páry aminokyselin 22 a 26, 26 a 30, 27 a 30 a 25 a 29, když R3 a R6 jsou



Lys, Orn, Glu nebo Asp, s výjimkou cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)(Leu²⁷)-hPTH-(1-34)-NH₂, cyklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-34)-NH₂ a cyklo(Lys²⁶-Asp³⁰)(Leu²⁷)-hPTH-(1-34)-OH.

20. Analog podle nároku 19, kde cyklizace má formu laktamu.
21. Analog podle nároku 20, kde laktam je i, i + 4 laktam.
22. Analog podle nároku 21, kde laktam je Glu²²-Lys²⁶ laktam.
23. Analog podle nároku 21, kde laktam je Lys²⁶-Asp³⁰ laktam.
24. Analog podle nároku 20, kde R je H a X je NH₂.
25. Analog podle nároku 24, kde R11 je Lys nebo Leu.
26. Analog podle nároku 25, kde R2 a R7 jsou Met nebo Nle.
27. Analog podle nároku 26, kde R1 je Ser, R2 je Met, R7 je Met, R8 je Glu, R9 je Arg, R10 je Lys a R12 je Gln.
28. Analog podle nároku 27, kde R3 je His nebo Lys, R4 je Leu, Lys nebo Arg, R5 je Asn, Orn, Hci, Asp, Arg, Lys, D-Lys, Ser nebo Gly a R6 je Ser, Lys Asp nebo Arg.
29. Analog podle nároku 27, kde R3-R6 jsou His-Lys-Lys-Lys, His-Leu-Lys-Lys, Lys-Lys-Lys-Lys nebo His-Leu-Lys-Ser.
30. Analog podle nároku 27, kde Y = X.
31. Analog podle nároku 27, kde Y = Val-X.
32. Analog podle nároku 27, kde Y = Val-Leu-Asn-Phe-X.
33. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 6.
34. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 7.
35. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 8.
36. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 9.
37. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 10.
38. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 11.
39. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 12.
40. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 13.
41. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 14.




42. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 15.
43. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 16.
44. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 17.
45. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 18.
46. Analog podle nároku 19, kde má SEQ ID NO: 19.
47. Způsob screeningu peptidových konstruktů na osteogenicitu vyznačený tím, že
 - (a) testovaná zvířata se anestetikují,
 - (b) testovanému zvířeti se dá podkožní injekce účinná dávka kandidátního peptidu nebo jeho farmaceuticky přijatelné soli rozpuštěného ve farmaceuticky přijatelném rozpouštědle,
 - (c) měření tepenného tlaku krve zvířete, kde malý pokles tlaku krve po krátké době ukazuje osteogenicitu peptidu.
48. Způsob podle nároku 47 vyznačený tím, že rozpouštědlem je okyselená solanka.
49. Způsob podle nároku 48 vyznačený tím, že rozpouštědlo obsahuje 0,0001M HCl.
50. Způsob podle nároku 49 vyznačený tím, že testovaným zvířetem je krysa a pokles tlaku krve je 8,5 až 36,2 % při 2 až 19 minutách po injekci.
51. Způsob podle nároku 50 vyznačený tím, že peptidem je hPTH fragment podle nároku 19.
52. Způsob podle nároku 51 vyznačený tím, že dávka hPTH je asi 0,8 nmol / 100 g tělesné hmotnosti.
53. Způsob podle nároku 52 vyznačený tím, že hPTH má SEQ ID NO: 3.
54. Způsob podle nároku 52 vyznačený tím, že hPTH má SEQ ID NO: 4.

20.04.99


98708

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-COOH

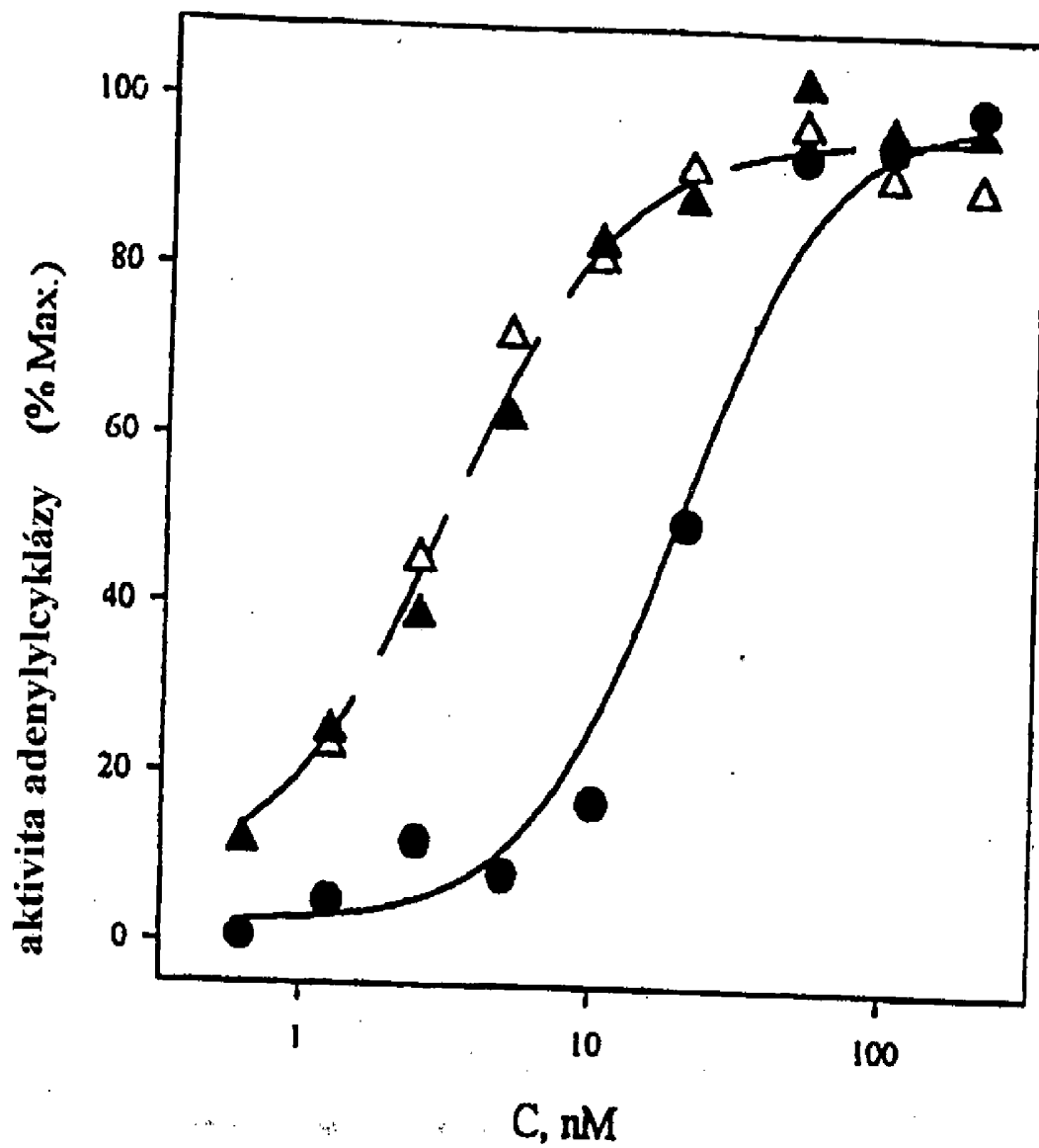
obr.1

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-

Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

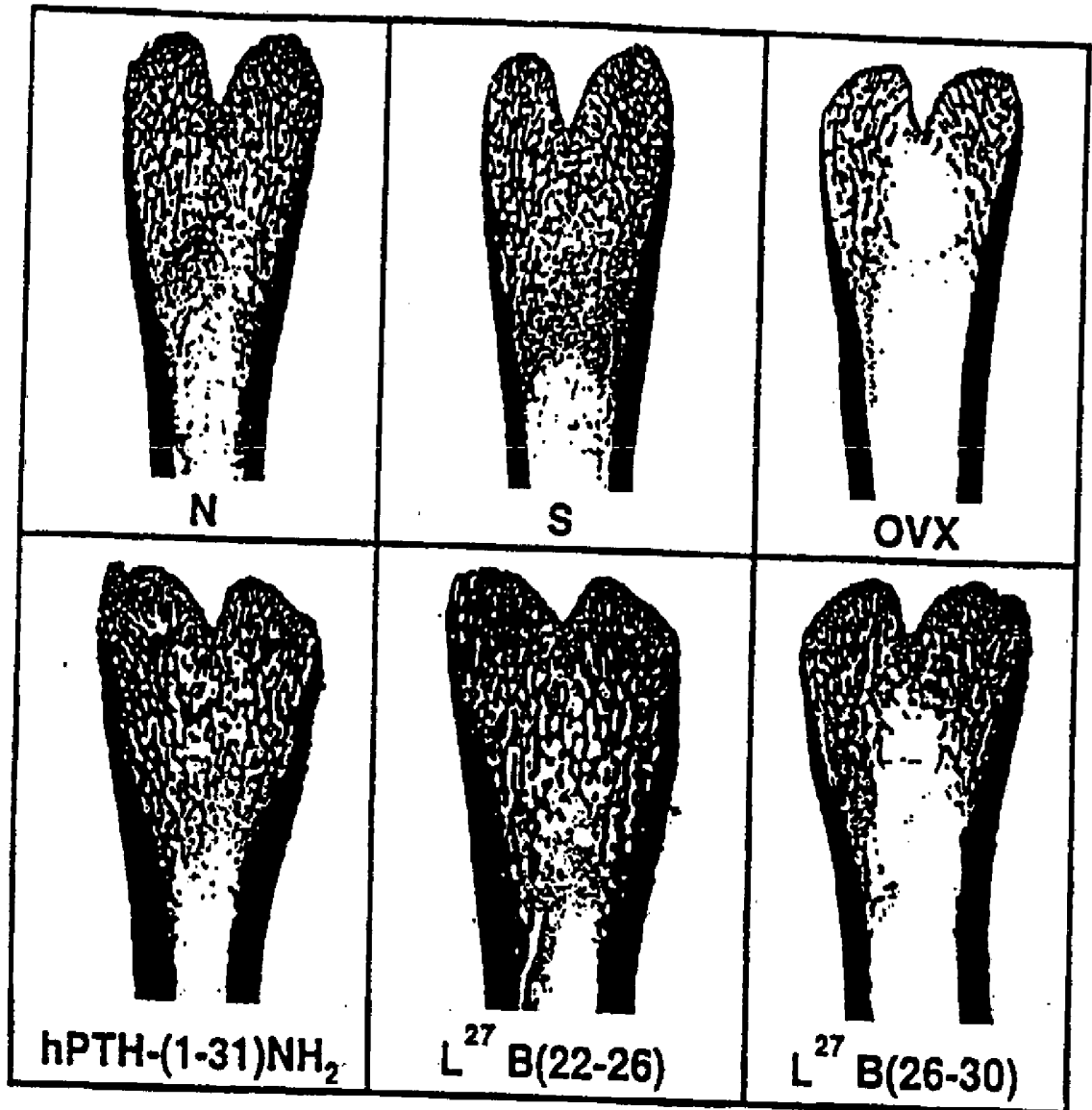
obr. 2

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-

Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

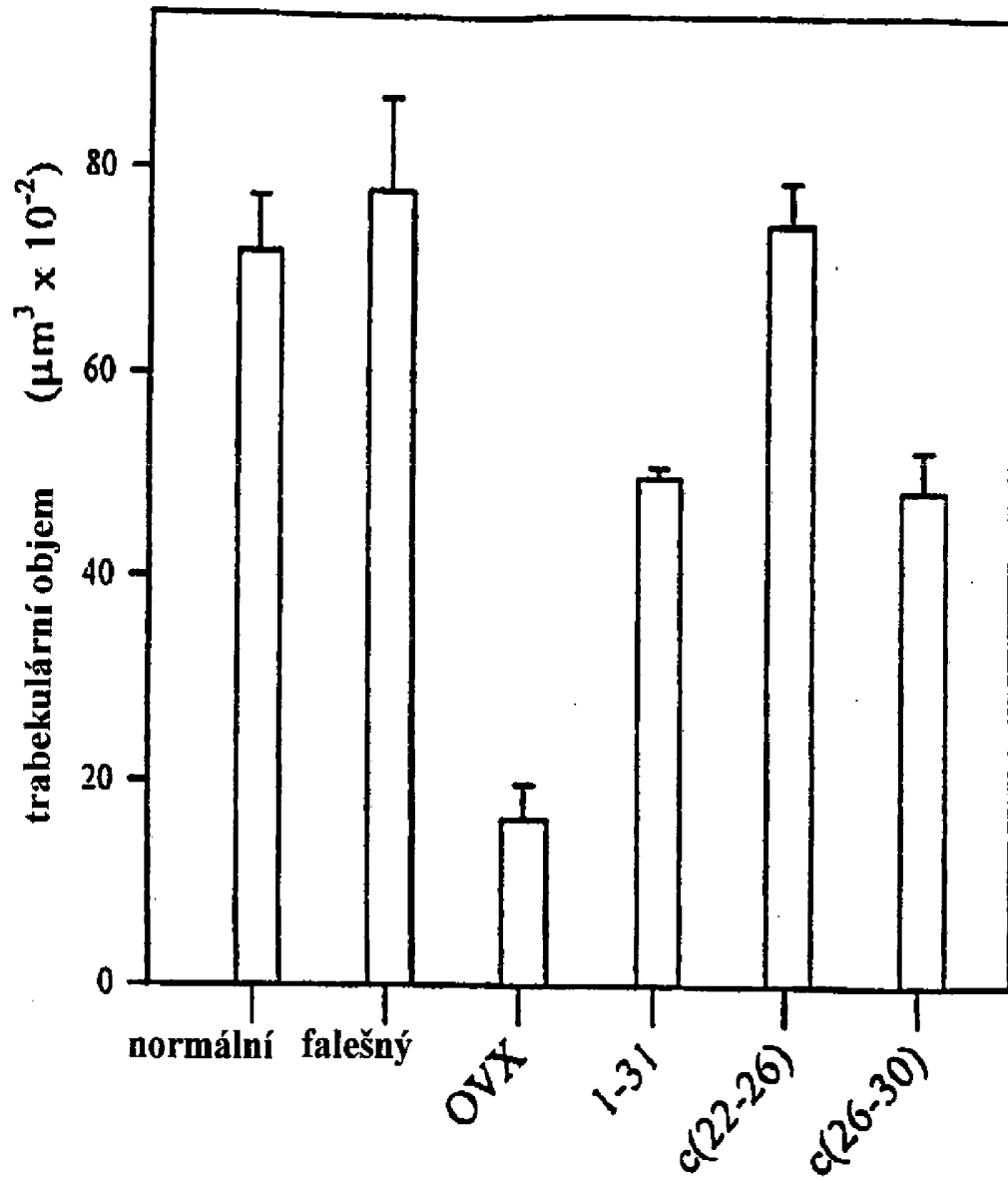
obr.3



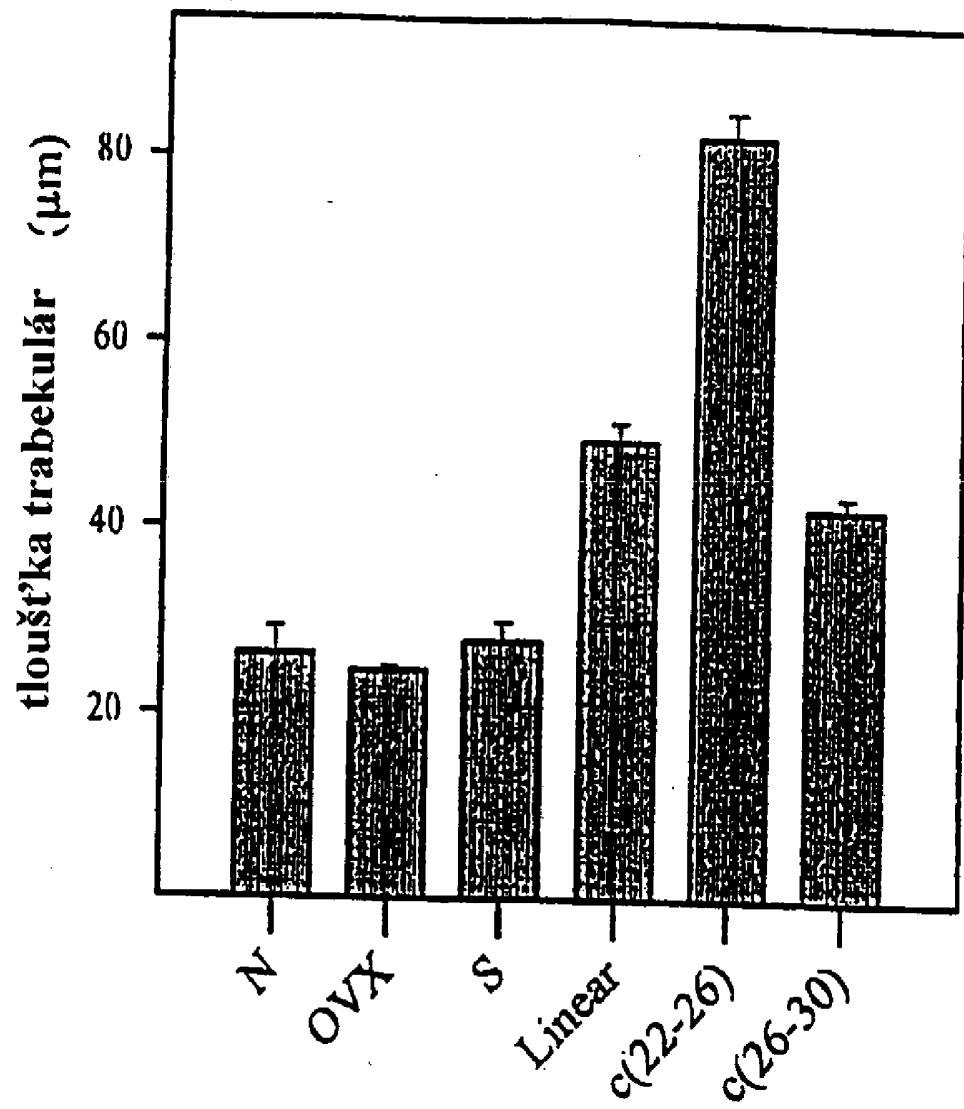
obr. 4



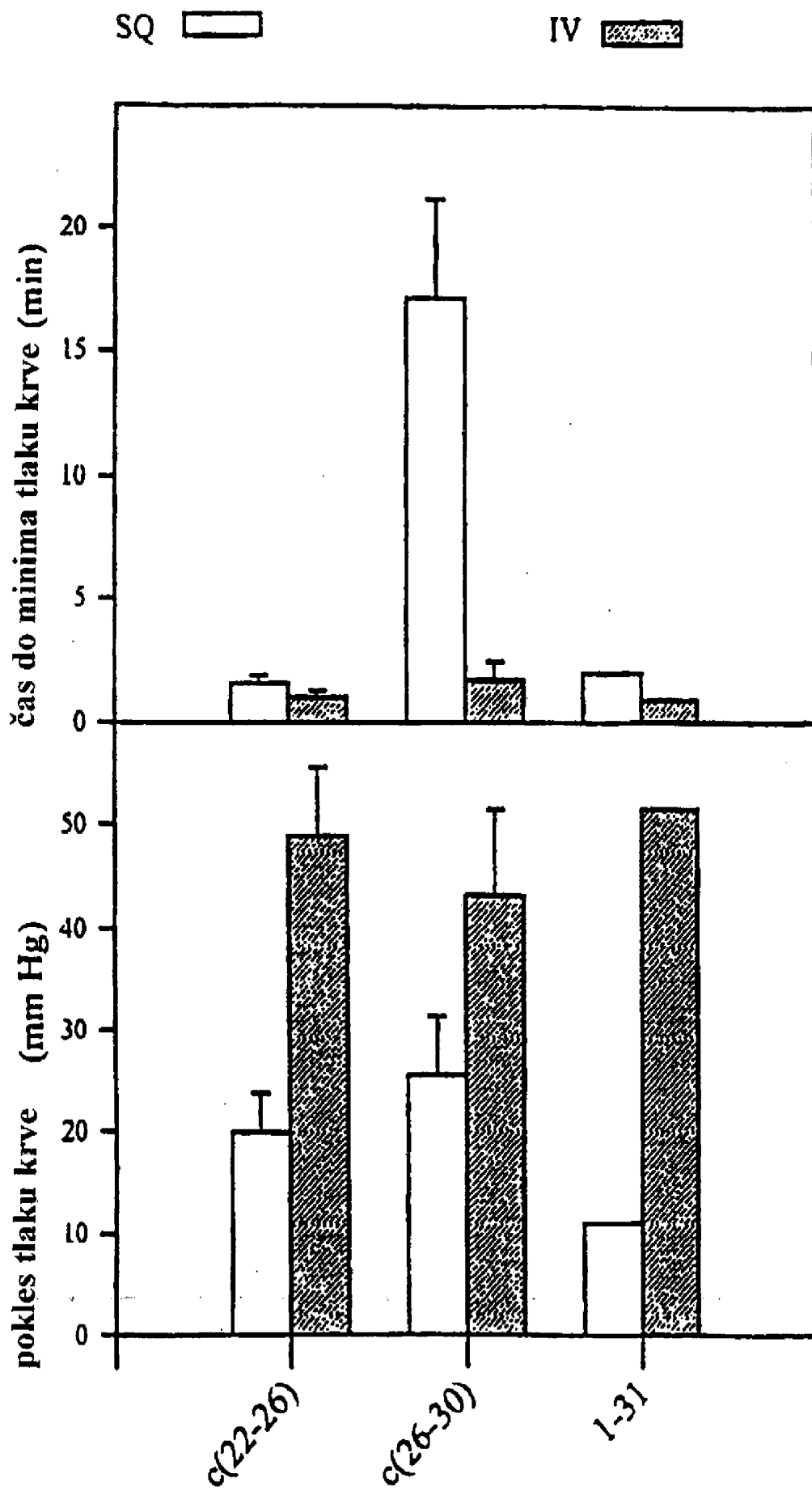
obr. 5



obr. 6



obr. 7



obr. 8

200499

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
 Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

obr. 9

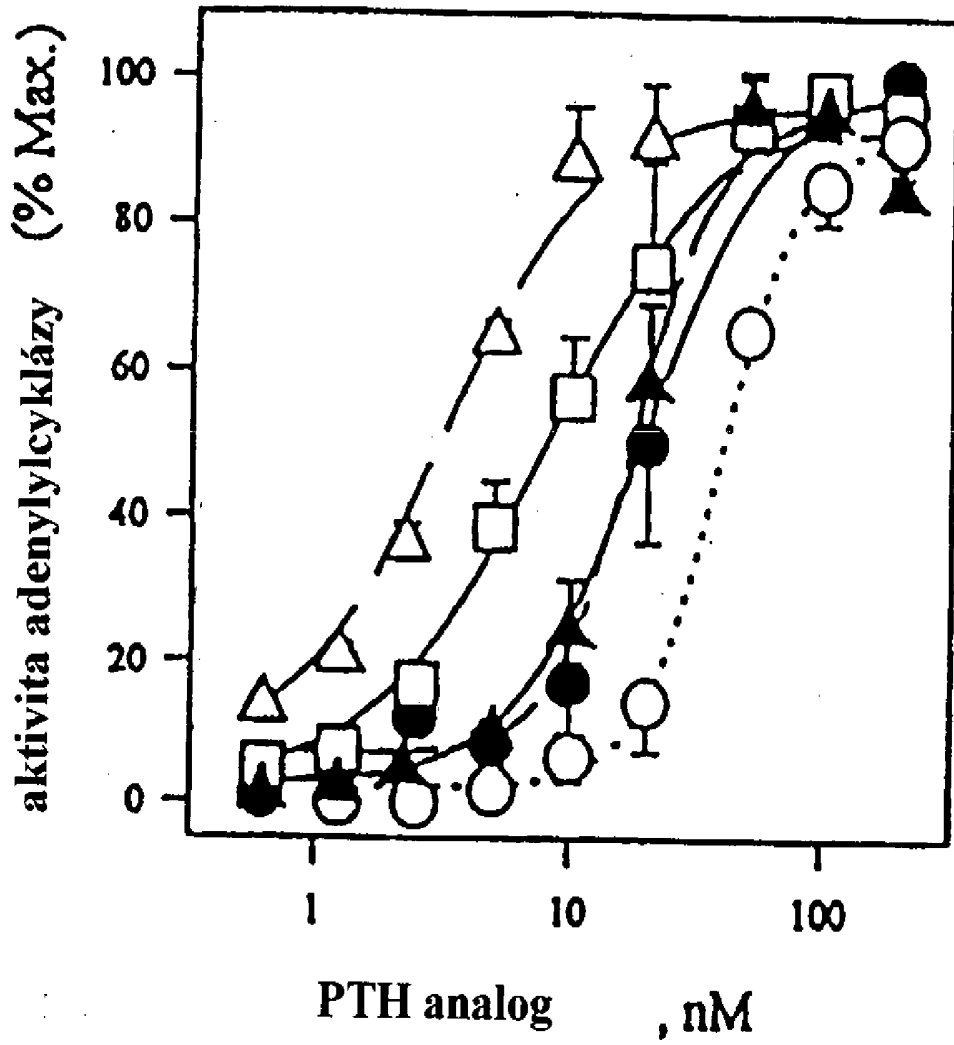
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
 Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

obr. 10

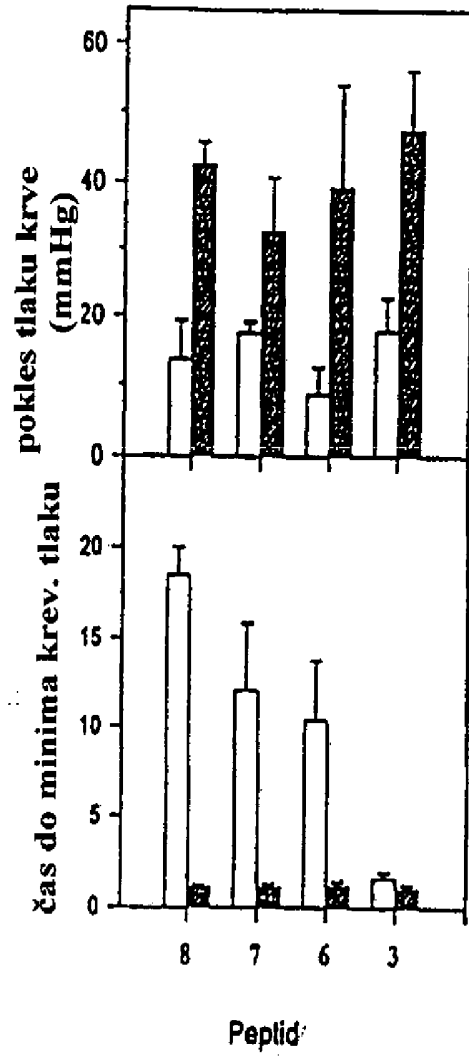
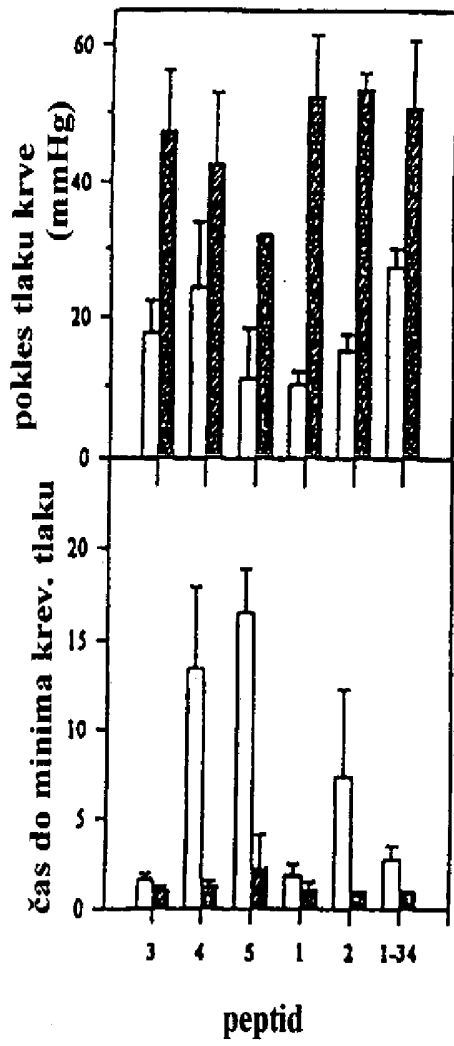
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-
 Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-NH₂

obr. 11

20.04.99

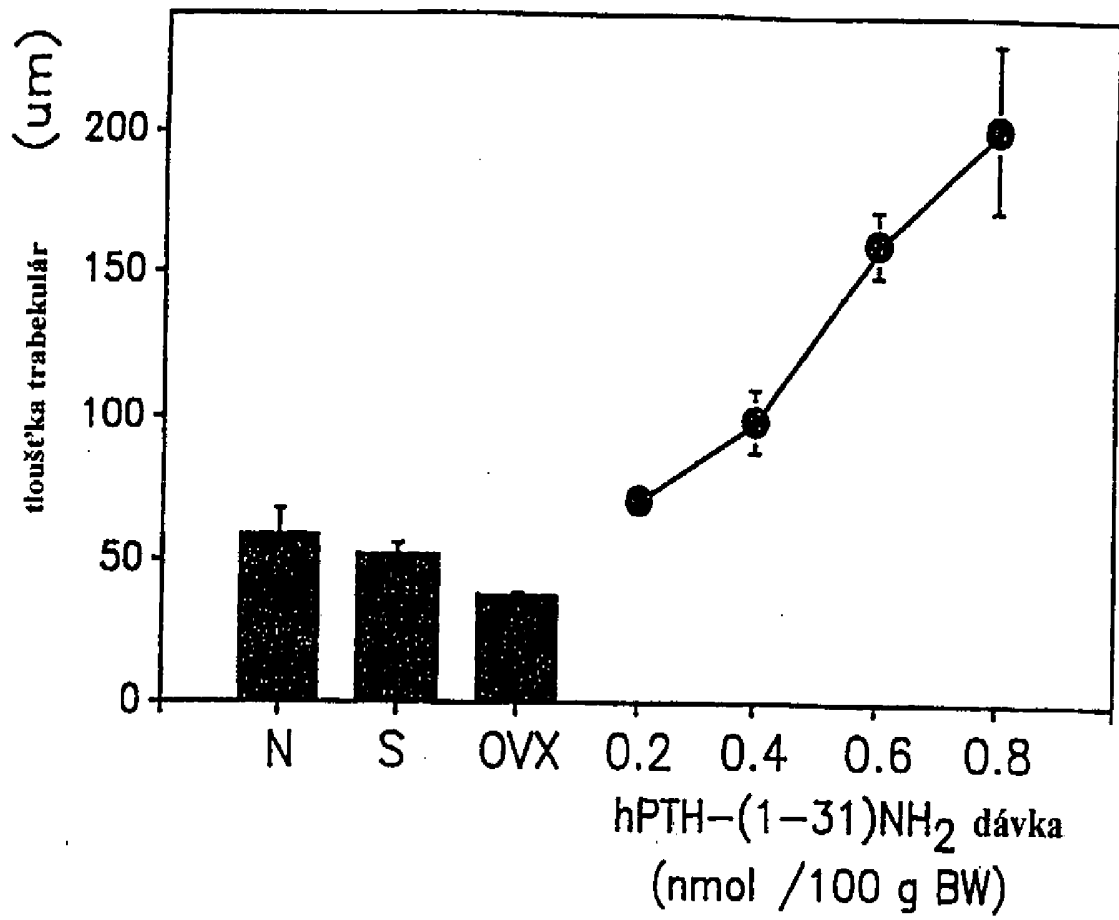


obr. 12



obr.13

20.04.99



Obr. 14

200499

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-

Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-OH

obr. 15

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-

Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-NH₂

obr. 16

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-

Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH

obr. 17

200499

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-

$\overbrace{\text{Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Ala-Leu-Gln-Asp-Val-NH}_2}$

obr. 18

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-

$\overbrace{\text{Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Nle-Leu-Gln-Asp-Val-NH}_2}$

obr. 19

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Nle-Glu-Arg-

$\overbrace{\text{Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-NH}_2}$

obr. 20

200499

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-

Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

obr. 21

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-

Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Ile-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

obr. 22

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Nle-Glu-Arg-

Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Tyr-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

obr. 23

200499

CH₃COHN-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-

Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

obr. 24

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-

Val-Lys-Trp-Leu-Arg-Glu-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

obr. 25

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Nle-Glu-Arg-

Val-Asp-Trp-Leu-Arg-Orn-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

obr. 26

20.04.99

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-

$\overbrace{\text{Cys-Trp-Leu-Arg-Cys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH}_2}$

obr. 27

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-

Val-Lys-Trp-Leu-Arg- $\overbrace{\text{Cys-Leu-Leu-Gln-Cys-Val-NH}_2}$

obr. 28