

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 990126 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **990126**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 14/635 (2006.01)

A61K 38/29 (2006.01)

C07K 14/63 (2006.01)

C07K 38/29 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **01.08.1997**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **22.01.1999**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **31.03.1999**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **01.08.1997 PCT/CA1997/000547**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

02.08.1996 US 691647

14.03.1997 US 040560

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •National Research Council of Canada, Building M-58, EG-10, 1200 Montreal Road, Ottawa, Ontario K1A 0R6, KANADA, (CA)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Barbier, Jean-Rene, Canada, KANADA, (CA)

2 •Morley, Paul, Canada, KANADA, (CA)

3 •Neugebauer, Witold, Canada, KANADA, (CA)

4 •Ross, Virginia, Canada, KANADA, (CA)

5 •Whitfield, James, Canada, KANADA, (CA)

6 •Willick, Gordon E., Canada, KANADA, (CA)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Papula Oy, Mechelininkatu 1 a, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Paratyreoideahormonianalogeja osteoporoosin hoitoon

Paratyreoideahormonanaloger för vård av osteoporos

LISÄKILPIRAUHASHORMONIANALOGIJA OSTEOPOROOSIN HOITAMISEKSI - PARATYROIDHORMONANALOGER FÖR VÅRD AV OSTEOPOROS

Keksinnön kohteena on ihmisen lisäkilpirauhashormonianalogit, joiden on havaittu olevan tehokkaita osteoporoosin hoidossa.

Osteoporoosi on ikääntyneiden, erityisesti ikääntyneiden naisten, johtava syy työkyvyttömyyteen. Vastikään on huomattu, että ihmisen lisäkilpirauhashormoni (hPTH) sekä tietyt analogit ovat luunkasvun kiihdyttäjiä, jotka ovat käyttökelpoisia osteoporoosin hoidossa. Osteoporoosi (luukato) on koko ajan paheneva sairaus, joka johtaa kokonaisluumassan vähenemiseen ja luun lisääntyneeseen haurastumiseen. Tauti aiheuttaa usein itsestään tapahtuvaa kuormitusta kantavien luiden murtumista ja ruumiillista ja henkistä rappeutumista, mikä on ominaista liikkumattomaksi tekeville vammoille. Estrogenin häviäminen aiheuttaa postmenopausaalisen osteoporoosin, joka laukaisee vuosikymmen-pitkän luun vaihtuvuuden kiihtymisen yhdessä lisääntyneen epätasapainon vanha luun resorption ja uuden luun muodostuksen välillä kanssa. Tämän tuloksena saadaan ohenemista, huokoisuuden lisääntymistä ja kuormitusta kantavien luiden trabekulaarista deplektiota. Osteoporoosi on myös yhdistetty kilpirauhasen liikatoimintaan, lisäkilpirauhasen liikatoimintaan, Cushingin oireyhtymään ja tiettyjen steroidilääkkeiden käyttöön. Hoitokeinoihin on historianmukaisesti kuulunut ruokavalion kalsiumin lisääminen, estrogeenihoito ja lisääntyneet annokset vitamiini D:tä, mutta etupäässä vaikuttavilla aineilla, kuten esim. antiresorptiivisesti vaikuttavien aineiden, jotka estävät luun resorptiota osteoklastien avulla.

Lisäkilpirauhanen tuottaa lisäkilpirauhashormonia (PTH), joka on veren kalsiumtasojen tärkeä säätäjä. PTH on polypeptidi ja synteettisiä polypeptidejä voidaan valmistaa menetelmällä, joka on esitetty jul-

kaisussa Erickson and Merrifield, The Proteins, Neurath et al., Eds., Academic Press, New York, 1976, sivu 257, ja modifioida menetelmällä, joka on esitetty julkaisuissa Hodges et al., (1988) Peptide Research 1, 19 tai Atherton, E. And Sheppard, R.C. Solid Phase Peptide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1989.

Kun seerumin kalsiumtaso laskee normaalitason alle, lisäkilpirauhanen vapauttaa PTH:a ja kalsiumtaso nousee luun kalsiumin resorption kautta, kalsiumin lisääntyneen absorption suolista kautta, ja kalsiumin lisääntyneen uudelleen absorption munuaisten munuaistiehyeissä syntyvästä virtsasta kautta. Vaikkakin alhaiset PTH-tasot jatkuvasti infusoituna voivat poistaa kalsiumia luusta, samat alhaiset annokset kun ne injektoidaan ajoittain voivat itse asiassa edistää luun muodostusta.

US patenttijulkaisussa 4,086,196 on esitetty ihmisen PTH analogeja ja väitetään, että ensimmäiset 27 - 34 aminohappoa ovat adenylyylisyklaasin stimulaatio termeinä tehokkaimmat in vitro solukokeessa. US patenttijulkaisussa 4,771,124, Rosenblatt, on esitetty hPTH-analogien, jossa Trp²³ on korvattu aminohapoilla fenyylialaniini, leusiini, norleusiini, valiini, tyrosiini, β -naftyylialaniini tai α -naftyylialaniini, ominaisuuksia PTH antagonisteina. Näistä modifioiduista hPTH analogeista on lisäksi poistettu 2 ja 6 aminoterminaaliset hapot mikä aiheuttaa enemmän agonisti toiminnan menetyksen kun niitä käytetään osteoporoosin hoitoon. Analogit suunniteltiin PTH:n ja PTH:n kanssa läheisesti yhteenkuuluvien peptidien inhibiittoreiksi. Analogien väitetään olevan mahdollisesti käyttökelpoisia joidenkin kasvainten yhteydessä esiintyvän hyperkalsemian hoidossa.

Julkaisussa Pang et al., WO93/06845, julkaistu 15.4.1993, on esitetty hPTH-analogeja, joissa Arg²⁵, Lys²⁶, Lys²⁷ korvataan useilla aminohapoilla, mukaan lukien alaniini, asparagiini, asparagiinihappo, systeii-

ni, glutamiini, glutamiinihappo, glysiini, histidiini, isoleusiini, leusiini, metioniini, fenyyialaniini, proliini, seriini, treoniini, tryptofaani, tyrosiini tai valiini. Analogien on ilman mitään vahvistavia
 5 tietoja eläin- tai ihmiskokeista väitetty olevan vaikuttavia osteoporoosin hoidossa yhdessä minimaalisen vaikutuksen verenpaineeseen ja sileisiin lihaksiin kanssa.

PTH toimii kahden toisiolähtetäjäsystemin
 10 aktivaation, G_s -proteiiniaktivoidun adenylyylisyklaasin (AC) ja G_q -proteiiniaktivoidun fosfolipaasin C_β aktiivoinnin, kautta. Jälkimmäisen seurauksena on membraanisidotun proteiinikinaasin C_s (PKC) aktiivisuuden stimulointi. PKC aktiivisuuden on osoitettu vaativan PTH
 15 tähteet 29 - 32 (Jouishomma et al., (1994) J. Bone Mineral Res, 9, (1179 - 1189)) On osoitettu, että luun kasvun lisäys, so. että vaikutus, joka on hyödyllinen osteoporoosin hoidossa, on kytketty peptidisekvenssin kykyyn lisätä AC aktiviteettia. On osoitettu, että na-
 20 tiivinen PTH sekvenssi sisältää kaikki nämä aktiviteetit. hPTH-(1-34) sekvenssi esitetään tyypillisesti kaavalla (A):

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

25

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

Gln Asp Val His Asn Phe-OH

A

30 Seuraavalla lineaarisella analogilla hPTH-(1-31)-NH₂, jonka tiedot on esitetty taulukossa 1 alla, on ainoastaan AC-stimuloiva aktiviteetti ja sen on osoitettu olevan täysin aktiivinen luukadon korjauksessa rotta, jolta munasarjat on poistettu, mallissa (Rixon,
 35 R.H. et al (1994) J. Bone Miner. Res. 9, 1179 - 1189; Whitfield et al (1996), Calcified Tissue Int. 58, 81 -

87; Willic et al, U.S. Patent No. 5,556,940, julkaistu 17.9.1996):

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 Nal-NH₂

B

Yllä olevassa molekyylissä B voi esitetyn amidipäättteen asemasta olla vapaa karboksyyli pääte.

Esillä olevan keksinnön tarkoitus on tuottaa uusia PTH-analogeja, joilla on suurempi metabolinen pysyvyys, lisääntynyt luun korjaus aktiviteetti, lisääntynyt AC-aktiviteetti ja minimaalisia kliinisiä sivuvaikutuksia.

Keksinnön eräänä tarkoituksena on tuoda esiin ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH ja sen farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja, joilla on alla oleva aminohapposekvenssi:

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

25

jossa

R = vety tai jokin suora tai haarautunut ketju alkyyli, asyyli tai aryyli-ryhmä,

R1 = Ser, Ala tai Aib,

R2 = Met tai luonnossa esiintyvä hydrofobinen aminohappo,

R3 = His tai vesiliukoinen aminohappo,

R4 = Leu tai vesiliukoinen aminohappo,

R5 = Asn tai vesiliukoinen aminohappo,

R6 = Ser tai vesiliukoinen aminohappo,

R7 = Met tai luonnossa esiintyvä hydrofobinen aminohappo,

- R8 = Glu, Lys tai Asp,
 R9 = Cys, Glu tai Orn,
 R10 = Arg, Lys, Orn, Gln, Glu tai Asp,
 R11 = luonnossa esiintyvä hydrofobinen tai polaarinen
 5 aminohappo,
 R12 = Gln, Arg, Glu, Asp, Lys tai Orn,
 X = OH, NH₂, ja
 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-
 10 X ja Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu-X, on syklisoitu ku-
 ten esimerkiksi yhden tai kahden aminohappoparin 22 ja
 26, 26 ja 30, 27 ja 39, ja 25 ja 29 välillä kun R3 ja
 R6 ovat Lys, Orn, Glu tai Asp, lukuunottamatta syk-
 lo(Lys²⁶-Asp³⁰)[Leu²⁷]-hPTH-(1-34)-NH₂, syklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-
 15 hPTH-(1-34)-NH₂ ja syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-[Leu²⁷]-hPTH-(1-
 34)-OH.

- Suolojen esimerkit käsittävät epäorgaanisten
 happojen suoloja, orgaanisten happojen suoloja, kuten
 esim. muurahaishapon, etikkahapon, viinihapon ja sit-
 20 ruunahapon ja epäorgaanisten emäksien suoloja, kuten
 esim. natrium ja ammonium ja orgaanisten emästen, ku-
 ten esim. trietyyliamiinin, etyyliamiinin ja metyyli-
 amiinin suoloja.

- Esillä olevan keksinnön toisen ominaisuuden
 25 mukaisesti syklisaatiota tehostetaan muodostamalla
 laktameja, aiheuttamalla valittujen aminohappoparien,
 kuten esim. luonnollisten tähteiden 22 ja 26 tai 26 ja
 30 välille, sivuketjujen kytkentää. Muita syklisaatio-
 tyyppejä, kuten esim. disulfidisillan muodostaminen,
 30 esim. Cys välillä käsittää analogit Cys²²-Cys²⁶ ja Cys²⁶-
 Cys³⁰, on myös tutkittu.

- Eri aminohappojen korvaamiset on myös havait-
 tu olevan tehokkaita. Lys²⁷ voidaan korvata Leu:lla tai
 useilla muilla luonnossa esiintyvillä hydrofobisilla
 35 tai polaarilla tähteillä. Toinen tekijä on kuinka
 hyvin tähte sopii reseptoriin. Ala ei ole yhtä hydro-
 fobinen kuin Leu. Lys:a ja Tyr:a pidetään yleensä po-

laarisina, mutta että niillä silti on hydrofobinen vuorovaikutus reseptorin kanssa. Lys esimerkiksi voi taittua niin, että hydrofobinen osa on vuorovaikutuksessa muiden hydrofobisten tähteiden kanssa reseptorissa, ja NH_2 on altistettu liuottimelle. Tällaiset korvaukset käsittävät ornitiinia, sitrulliinia, α -aminobutyryihappoa, alaninia, norleusiinia, isoleusiinia tai tyrosiinia tai jokaista suoraa tai haarautunutta α -aminoalifaattista happoa, jossa on 2 - 10 hiiliatomia sivuketjussa, jokaista sellaista analogia, jossa on polaarinen tai varauksella varustettu ryhmä alifaattisen ketjun päässä. Esimerkkejä polaarista ryhmistä tai varauksella varustetuista ryhmistä ovat: amino, karboksyyli, asetamido, guanido, ja ureido.

15 Vaikkakin vaikuttaa siltä, että Leu^{27} on paras korvaus, vaikuttaa myös siltä, että monen muun kohdan 27 korvaaminen pitää sisällään lähes täyden tehon ja voi myös omata toivotut ominaisuudet, kuten esim. lisääntynyt proteolyyttinen pysyvyys tai vesiliukoisuus,

20 Ile:n, norleusiinin, Met:n ja ornitiinin odotetaan olevan kaikista tehokkaimpia.

Tämä korvaaminen saa aikaan α -heliksin stabilisaation hormonin reseptorisitovalla alueella. Tämä on vahvistettu tutkimalla laktamianalogien sirkulaarista dikroismispektrumia, verrattuna lineaarisen molekyylin $[\text{Leu}^{27}]\text{-hPTH-(1-31)-NH}_2$ sirkulaariseen dikroismispektriin. Sirkulaariset dikroismispektrit ovat hyvin herkkiä α -heliksin sekundääriseen rakenteen läsnäololle ja tekniikkaa on käytetty osoittamaan α -heliksin läsnäoloa hPTH-fragmenteissa (Neugebar et al., (1991), Biochemistry 31, 2056 - 2063). Lisäksi α -heliksin stabilointia edellä mainittuja laktameja hPTH-(20-34)- NH_2 muodostettaessa on esitetty julkaisussa (Neugebauer et al., (1994), Int. J. Protein Peptide Res. 43, 555 - 562). hPTH-(1-31)- NH_2 tähteiden 21 ja 31 välillä on potentiaalinen amfifiilinen α -heliksi, ja on esitetty tietoja, jotka osoittavat, että tämän he-

liksin hydrofobinen pinta on vuorovaikutuksessa PTH reseptorin kanssa (Neugebauer, W. et al., (1995), Biochemistry 34, 8835 - 8842; Gardella, T-J. et al., (1993), Endocrinology 132, 2024 - 2030).

5 On havaittu, että tehokkain syklisaatio käsittää laktamin muodostuksen, esim. välillä tähteet Glu²² ja Lys²⁶, tai Lys²⁶ ja Asp³⁰. Muut syklisaatiot ovat myös mahdollisia, kuten esim. välillä Lys²⁷ ja Asp³⁰, vaikkakin on havaittu, että tämä laktami osoittaa jonkin verran α -heliksiä epävakaaaksi tekevää vaikutusta.

Erityisesti PTH-fragmenttien reseptoroivat tutkimukset ovat osoittaneet ensisijaisen sidosalueen tähteiden 14-34¹ sisällä. On ehdotettu, että tähteet 15 17-29 α -heliksi sitoutuu sellaisenaan PTH reseptoriin, ja että tämän α -heliksin amfifiilinen osa sitoutuu hydrofobisella pinnallaan reseptoriin². Tämä malli on yhtäpitävä reseptoria sitovan-alueen analogien tutkimuksen tulosten kanssa³.

20 NMR-tutkimukset ovat osoittaneet, että myös mallipeptidi, jonka on havaittu olevan erittäin spiraalimainen CD:llä, myös pitää sisällään monia ei spiraalimuotoisia rakenteita. Siten reseptorisidotun peptidi hormonin, kuten esim. PTH, rakennetta ei voida 25 päätellä luotettavasti sen vapaasta rakenteesta liuoksessa. Peptidihormonien väkinäisiä analogeja on käytetty rajoittamaan rakenteellisten olomuotojen määrää⁸, jotka ovat käyttökelpoisia peptideille. hPTH sekvenssin tutkimus tuo esiin 3 mahdollista suolasiltaa tähteiden 17-29 sisällä, jotka voivat joko stabiloida tai 30 tehdä α -heliksin epävakaaaksi. Nämä ovat välillä Glu²² ja Lys²⁶, ja Lys²⁶ ja Asp³⁰, joiden kummankin odotetaan stabiloivan α -heliksin, ja välillä Lys²⁷ ja Asp³⁰, jonka odotetaan tekevän α -heliksin epävakaaaksi⁴. Laktamimuodostus näiden tähdeparien välillä rajoittaisi hPTH:lle 35 saatavia rakenteita tällä spiraalinmuotoisella alueella. Lisäksi kaksi näistä laktameista Glu²²-Lys²⁶ ja

Lys²⁶-Asp³⁰, joiden odotetaan stabilisoivan α -spiraalimuotoista rakennetta, sijaitsevat amfifiibisen osan polaaraisella pinnalla. Kolmannen Lys²⁷-Asp³⁰ odotetaan ainakin osaksi tekevän α -heliksin epävakaaksi ja
 5 sisältää tähteen Lys²⁷, joka on amfifiibisen heliksin hydrofobisella pinnalla. Syklisaatio kohtien 25 ja 29 välillä voi myös tapahtua jos Lys tai Orn korvaa Arg kohdassa 25, ja jos GLN²⁹ korvataan Glu tai Asp.

Lys²⁷ korvaaminen Leu:lla saa aikaan hydrofo-
 10 bisemmän tähteen amfifiibisen heliksin hydrofobisella pinnalla. Tämä saa aikaan lisätyn adenylyylisyklaasia stimuloivan tehon ROS-solulinjassa. Alan ammattimies ymmärtää täysin, että myös muilla korvauksilla, kuin mitä edellä on esitetty, saadaan todennäköisesti ai-
 15 kaan analogeja, joilla on sama tai lisääntynyt teho.

Korvauksen ja jommankumman laktaamimuodostuk-
 sen yhdistetyn tehon odotetaan stabiloivan α -heliksin ja lisäävän biotehoa, ja suojaavan tätä molekyylin aluetta proteolyttiseltä hajaoamiselta. Amidin läsnä-
 20 olo C-päänteessä on edullinen siinä merkityksessä, että odotetaan sen lisäksi suojaavan peptidiä eksopro-
 teolyttistä hajoamista vastaan, vaikkakin jokin pep-
 tidaasi saattaa hydrolysoida niitä (Leslie, F.M. ja Goldstein, A. (1982) *Neuropeptides* 2, 185 - 196).

25 On myös havaittu, että voidaan tehdä myös muita käyttökelpoisia aminohappo korvauksia. Erityisesti pelkistysherkkä Met tähde kohdissa 8, 18 voidaan korvata luonnossa esiintyvällä hydrofobisella tähteel-
 lä, Nle kuten Japanilaisessa patenttijulkaisussa 61-
 30 24598 on esitetty. Voidaan myös odottaa, että muut tällaiset hydrofobiset tähteet, kuten Leu, Ile, Val, Phe ja Trp myös ovat käyttökelpoisia, kuten julkaisus-
 sa US patent 5,393,869, Nakagawa et al., on esitetty.

Vastakkaisia laktameja on myös tutkittu. Esi-
 35 merkiksi on osoitettu Lys²²-Glu²⁶:n vaihdon teho. Siksi voidaan odottaa, että samanlaisia vaihtoja voidaan

hyödyllisesti tehdä esim. laktamien 26-30 ja 27-30 välillä.

Toinen korvaus edullisessa laktamikohdassa 22-26 on edellä mainitun Cys-Cys se on Asp²²-Orn²⁶ lisäksi tehty esittämään, että voidaan käyttökelpoisesti tehdä erilaisia syklisaatio/rengas-kokoja.

Julkaisussa US 5,393,869, Nakagawa et al., ja US 5,434,246, Fukuda et al., on esitetty, että erityisesti joillakin substituoiduilla hPTH analogeilla on olennaista AC tehoa ja saattaa olla lisääntynyt pysyvyys protelyyttista hyökkäystä vastaan,

1. Ser-1 Aib:lla (α -aminoisobutyryihappo)

2. Lys-27 Gln:lla (ilmoitetaan olevan 2,5 x AC teho)

3. Tähteet 14, 15, 16, 17 Lys:lla, kokonaisuudessaan tai osittain 9 on ilmoitettu suuresti lisäävän tehoa - aina 8-kertaiseksi. Tämä voi johtua vesiliukoisuuden lisääntymisestä. In vivo näiden oodetaan olevan labiileimpia trypsiinitapaisille entsyymeille). Vaatimuksissa on esitetty tämä tetrapeptidi (tähteet 14 - 17, mukaan lukien) siten, että siinä on ainakin yksi vesiliukoinen aminohappo. Esimerkiksi His-14 tai Lys-14; Leu-15, Lys-15 tai Arg-15; Asn-16, Orn-16, Hci (homositrulliini)-16, Asp-16, Arg-16, Lys-16, Dlys-16, Ser-16 tai Gly-16; ja 17-Ser, 17-Lys, 17-Asp tai 17-Arg. Voi myös käsittää Glu esimerkkiä varten.

4. Arg 25 His:lla proteaasihyökkäyksen minimoimiseksi. Koska laktamit erityisesti Leu:n kanssa tai muun hydrofobisen aminohapon kanssa kohdassa -27, voivat tulla vähän liukenemattomimmiksi ja myös vaikeammaksi liuottaa, voidaan odottaa, että sama korvaus olisi käyttökelpoinen meidän laktameissa.

Alan ammattimies ymmärtää myös täysin, että vaikkakin 1-31 hPTH syklit voivat olla edullisia voidaan myös tiedoista, joita edellä on esitetty, odottaa, että sykliset fragmentit alueella 1-30 - 1-37

myös ovat tehokkaita. Kirjallisuudessa ei nimenomaan ole olemassa näyttöä siitä, että lisäaminohappojen, aina 37 asti, läsnäolo vaikuttaisi hormonin biologisiin ominaisuuksiin, erityisesti annetut varmistavat
 5 1-34 tiedot sisällytetään tähän.

Keksinnön mukaisia laktameja voidaan valmistaa tunnetuilla alla esitetyillä menetelmillä ja niitä voidaan käyttää luun kasvun stimuloimiseen, luun vahvistamiseen ja edistämään luun paranemista eri olosuhteissa, kuten esim. osteoporoosin hoidossa ja tavallisissa luunmurtumissa.
 10

Seuraavassa keksintöä kuvataan yksityiskohdaisesti viittaamalla oheisiin esimerkkeihin ja kuviin, joissa

15 kuva 1 esittää luonnonmukaisen ihmisen PTH :n rakenteen, tähteet 1-31 (SEKVENSSI ID NO:1),

kuva 2 esittää sekvenssin [Leu²⁷]syklo((Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO:3) rakenteen,

kuva 3 esittää sekvenssin [Leu²⁷]syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 4) rakenteen,
 20

kuva 4 esittää keksinnön mukaisten analogien aktiviteettia ROS 17/2 solujen adenylyylisyklaasi stimulaatiossa,

kuva 5 esittää histologisia luuleikkauksia, joita on preparoitu 8:n viikon lopussa OVX jälkeen, jotka esittävät hPTH-(1-31)NH₂ ja sen laktamien kykyä estää luukatoa ja stimuloida luun kasvua Sprague-Dawley rotissa, joilta munasarjat on poistettu (OVX),
 25

kuva 6. esittää vertailueläimien ja hPTH analogilla hoidettujen eläimien, rottien aluksi kovin depletoidua luun, trabekulaarista luuvolyymia. Eläimien hoito aloitettiin 9 viikkoa OVX:an jälkeen Fragmenteista [Leu²⁷]syklo[Glu²²-Lys²⁶]hPTH-(1-31)-NH₂ oli tehokkain, palauttaen luun arvot normaaleissa vertailurotissa oleviin arvoihin, ja
 30
 35

kuva 7 esittää normaalien eläimien, eläimien, joilta munasarjat on poistettu (OVX), Sham ja eläimi-

en, joita on käsitelty hPTH-(1-31)-NH₂:lla, [Leu²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁵)-hPTH-(1-31)-NH₂:lla, ja [Leu²⁷]-syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂:lla, rottien reisiluun trabekulaarisen luun paksuutta,

5 kuva 8 esittää verenpaineen maksimilaskun ja ajan verenpaineen maksimilaskuun lisättäessä lisättäessä 0,8 nmoolia/100g annosta hPTH-(1-31)-NH₂, [Leu²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂, tai [Leu²⁷]-syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂. Peptidi annostettiin jo-
10 ko ihonalaisesti (subkutaanisesti) (avoin pylväs) tai laskimonsisäisesti (intravenously) (varjostettu pylväs),

kuva 9 esittää sekvenssin [Leu²⁷]-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO 5) rakenteen

15 kuva 10 esittää sekvenssin (Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO:6) rakenteen,

kuva 11 esittää sekvenssin [Leu²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO:7) rakenteen,

kuva 12 esittää eri keksinnön mukaisten analogien adenyylisyklaasien stimuloivan vaikutuksen,
20

kuva 13 esittää hPTH(1-31)NH₂:n ja hPTH(1-30)NH₂:n ja niiden syklisten analogien hypotensiivisen vaikutuksen,

kuva 14 esittää käyrää, joka kuvaa lineaarisen hPTH(1-31)-NH₂ eri annosten vaikutusta luun kasvuun,
25

kuva 15 esittää sekvenssin [Leu²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-OH (SEKVENSSI ID NO: 8) rakenteen,

kuva 16 esittää sekvenssin [Leu²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-34)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 9) rakenteen,
30

kuva 17 esittää sekvenssin [Leu²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-34)-OH (SEKVENSSI ID NO: 10) rakenteen,

kuva 18 esittää sekvenssin [Ala²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 11) rakenteen,

kuva 19 esittää sekvenssin [Nle²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 12) rakenteen,
35

kuva 20 esittää sekvenssin [Nle^{8,18},Leu²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 13) rakenteen,

kuva 21 esittää sekvenssin syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 14) rakenteen,

kuva 22 esittää sekvenssin [Ile²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO:15) rakenteen,

kuva 23 esittää sekvenssin [Tyr²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 16) rakenteen,

kuva 24 esittää sekvenssin α -asetyyli-[Leu²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 17) rakenteen,

Kuva 25 esittää sekvenssin [Leu²⁷]syklo(Lys²²-Glu²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 18) rakenteen,

kuva 26 esittää sekvenssin [Leu²⁷]syklo(Asp²²-Orn²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 19) rakenteen,

kuva 27 esittää sekvenssin [Cys²²;Cys²⁶;Leu²⁷]-syklo(Cys²²-Cys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO: 20) rakenteen,

kuva 28 esittää sekvenssin [Cys²⁶;Cys³⁰;Leu²⁷]-syklo(Cys²⁶-Cys³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEKVENSSI ID NO:21) rakenteen.

Hormonianalogien valmistus

Kiinteäfaasi peptidisynteesin tekniikkaa, joka on R.B. Merrifieldin kehittämä ("Solid-Phase Peptide Synthesis", Advances in Enzymology 32, 221-296, 1969), liitetään tähän referenssinä, on laajalti ja menestyksellisesti käytetty polypeptidien, kuten esim. lisäkilpirauhashormonin, syntetisoimiseen. Strategia perustuu sille, että peptidin karboksyylipäätteinen aminohappo kiinnitetään kiinteään kantajaan. Peräkkäiset aminosäkkeet lisätään tämän jälkeen suurena määränä. N-terminaalinen α -aminoryhmä suojataan sellaisella tavalla, että tämä suojaava ryhmä voidaan poistaa ilman että peptidi poistetaan kiinteältä kantajalta. Tässä käytetty kemia käsittää muunnelman alkuperäisestä Merrifieldin menetelmästä, johon viitataan Fmoc ratkais-

mallina. Fmoc (fluorenyylimetoksikarbonyyli) ryhmä voidaan poistaa miedoissa alkaalisissa olosuhteissa, mikä jättää alkalille stabiilit soivuketjuja suojaavat ryhmät ja sidoksen kantajaan koskematta. Tämä tekniikka on esitetty julkaisussa E.Atherton and R.C. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach", IRL Press, New York, N.Y., joka liitetään referenssinä tähän.

Esimerkki 1

10 Lineaaristen hPTH-(1-31)-amidianalogien valmistus ja puhdistus

Aminohappojen α -aminoryhmät suojataan 9-fluorenyylimetoksikarbonyylillä (Fmoc) kytkennän aikana. Kytkennät suoritetaan seoksella, jossa on hydroksibensotriatsolia (HOBt), 2-(1H-bensotriatsol-1-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyliuroniumtetrafluoriboraattia (TBTU), ja di-isopropyylietyyliaminia (DIPEA). Käytetään 4-ker-
 15 tainen ylimäärä aktivoitua aminohappoa yhdessä kaksoiskytkennällä lisättäessä Asn, Gln, His, Val ja Ile
 20 tähteitä. Arg ja Gly lisäyksen kytkentäajat pidennetään kolmestakymmenestä (30) kuuteenkymmeneen (60) minuuttiin. Ensimmäisen tähteen (Val³¹) kytkeminen kantajaan (Tentangel* R. Rapp Polymere, Tubingen, Saksa) tehdään manuaalisesti. Kaikki muut vaiheet tehdään
 25 PerSeptive Biosystems* Model 9050 Plus automatisoidulla peptidisyntetisoijalla. Sivuketjusuojaukset tehdään seuraavasti: Arg (2,2,5,7,8-pentametyylikroman-6-sulfonyyli); Glu, Asp ja Ser (t-butyylili); His, Gln ja Asn (trityyli); Trp (t-butyylimetoksikarbonyyli).

30 Sen jälkeen kun Fmoc on poistettu N-terminaalisisesta Ser, peptidihartsia pestään DCM, jonka jälkeen se lohkaistaan hartsista ravistamalla 7,5 ml:lla reagenssia K:lla (6,19 ml TFA, 0,38 ml kutakin vettä, 90% fenoli/vesi ja tioanisolia ja 0,19 ml 1,2-etaaniditiolia) 4 h lämpötilassa 20°C. Lohkaistu peptidiseos poistetaan suodattamalla ja saostetaan lisäämällä siihen t-butyylimetyylietteriä. Sakka otetaan

talteen linkoamalla, pestään 2 X t-butyylimetyyli-eetterillä ja kuivataan vakuumilinkouksella.

Raaka tuote liuotetaan 14 ml:an 15%:sta asetonitriili/vettä, 0,1 % TFA ja kromatoidaan Vydac* C_{18} -kolonnilla (10 μ , 1 x 25 cm). Tuote eluoidaan 1 %/min asetonitriili (14-40%) gradientilla 0,1 % TFA:ssa vedessä. Lopullisen tuotteen puhtaus arvioidaan analyttisellä HPLC:lla Vydac* C_{18} -kolonnilla (10 μ , 0,4 x 25 cm) ja molekyylimassan määrittämisellä elektrosuihkumassaspektrometrillä (VG Quattro). Näin muodostuneen hPTH:n tiedot on annettu alla taulukossa 1.

Esimerkki 2

Syklisten analogien valmistus ja puhdistus

[Leu²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂. Tämä peptidi syntetisoidaan kuten edellä esimerkissä 1 on esitetty, jossa Lys-Alloc ja Glu-OAll on substituoitu kohdassa 26 ja vast 22. Fmoc-Ser¹⁷ lisäyksen jälkeen peptidihartsin poistetaan kolonnista reaktiopulloon (Minivial*, Applied Science), suspendoidaan 1,7 ml:an liuosta, jossa on tetrakis(trifenyylifosfiini)palladiumi(0) (0,24 mmoolia), 5 % etikkahappoa ja 2,5 % N-metyylimorfoliinia (NMM) dikloorimetaanissa (DCM) argonatmosfäärissä, jonka jälkeen ravistetaan lämpötilassa 20°C 6 h allyyli- ja allocsuojaavien ryhmien poistamiseksi (Sole, N.A. et al., (1993) Peptides; Chemistry, Structure, and Biology, Smith, J And Hogges R. (Eds.), ESCOM pp. 93 - 94), joka liitetään tähän referenssinä. Peptidihartsin pestään tämän jälkeen 0,5 %:sella dietyyliditiokarbamaatilla (DEDT), 0,5 % NMM DMF:ssa (50 ml), jonka jälkeen DMF:llä (50 ml) ja DCM:lla (50 ml). Peptidi (0,06 mmoolia) syklisoitiin ravistamalla se yhdessä 0,06 mmoolia 1-hydroksi-7-atsabensotriatsolin (HOAt)/0,12 mmoolia NMM 2 ml:ssa DMF kanssa 14 h lämpötilassa 20°C (Carpino, L.A. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115, 4397 - 4398). Peptidihartsin suodatetaan ja pestään sen jälkeen kerran DMF:lla pakataan uudelleen kolonniin ja pestään

DMF:llä kunnes kuplat on poistettu suspensiosta. Jäljellä oleva synteesi tehdään kuten esimerkissä 1 paitsi, että N-terminaalinen Fmoc-ryhmä ei poisteta. Fmoc-peptidi lohkaistaan hartsista reagenssi K:lla niin
 5 kuin edellä on esitetty. HPLC tehdään kuten esimerkissä 1, jolloin Fmoc ryhmä poistetaan ennen lopullista HPLC:.a.

Analogi [Leu²⁷]syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ valmistetaan analogisella tavalla.

10

Esimerkki 3

Adenylyylisyklaasimäärityksiä

hPTH analogien kykyä sitoutua reseptoreihin ja aktivoida adenylyylisyklaasiin kytkettyä merkinantomekanismia määritetään erikoistumiseen kykenevän osteoblastitapaisella ROS 17/2 rotta osteosarkoma (ROS)
 15 solulinjalla. Aktiviteetin tiedetään olevan tiiviisti kytkettynä analogin kykyyn palauttaa luun massaa rottissa, joilta munasarjat on poistettu. Adenylyylisyklaasistimuloiva aktiviteetti arvioidaan merkitsemällä
 20 etukäteen solumainen ATP-pooli [³H]-adeniinillä ja sen jälkeen mittaamalla määrä [³H]-syklistä AMP:a, joka muodostuu [³H]-ATP:sta ensimmäisten 10 min, jolloin altistetaan tietylle analogille, aikana. Tämä perustuu menetelmään, joka on esitetty julkaisussa Whitfield et
 25 al, J. Cellular Physiology 150,299 - 303, 1992, joka liitetään tähän referenssinä.

Adenylyylisyklaasi tulokset on esitetty taulukossa 2 alla pitoisuutena, joka vaaditaan osoittamaan puolet maksimaalisesta lisäyksestä AC aktiviteetissa.
 30 Tiedot on myös esitetty kuvassa 4. Kuvassa 4 varjostetut ympyrät esittävät hPTH-(1-31)-NH₂:n adenylyylisyklaasia stimuloivaa aktiviteettia ja [Leu²⁷]syklo(Lys²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂:n ja [Leu²⁷]syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂:n aktiviteetit on esitetty varjostamattomilla ja vast. varjostetuilla kolmioilla.
 35

Esimerkki 4

hPTH-analogien anabolisten aktiviteettien
määrittäminen rottamallilla, jolta munasarjat on poistettu

Annostus:

- 5 Annokset perustetaan annos-vaste tiedoille
hPTH(1-31)-NH₂:sta. hPTH(1-31)-NH₂ luurakentumisteho
määritetään käyttämällä useita eri annoksia (0,8, 0,6,
0,4 ja 0,2 nmoolia/100g ruumiinpainoa) ja uudiskas-
vuista tai hoitoa arvioivaa pikemmin kuin ennalta eh-
10 käisevää mallia¹¹. 3 kuukautta vanhojen rottien, joilta
munasarjat poistetaan, annetaan olla rauhassa 9 viik-
koa niin että suurin osa ei-levymäisestä reiden trabe-
kulaarisesta luusta annetaan depletoitua ankarasti en-
nen kuin aloitetaan päivittäin annettavat 6 viikkoa
15 kestävät injektiot. 9:en viikon lopussa ne ovat menet-
täneet n. 75 % reiden trabekulaarisesta luumassasta.
Kuvassa 14 esitetään annoksesta riippuva lisäys kes-
kitrabekulaarisessa paksuudessa, jonka aiheuttaa la-
mellaarinen saostuminen, jonka aikaansaavat fragmentin
20 36 neljänä eri annoksena annetut injektiot. Fragmentti
pystyy myös stimuloimaan trabekulaarisen luun kasvua
paljon vanhemmissa rotissa. Siten 36 injektiota, joi-
den hPTH-(1-31)-NH₂ keskivertopitoisuus on 0,6 nmoo-
lia/100 g ruumiinpainoa pystyy merkittävästi lisäämään
25 keski-trabekulaarista paksuutta yli normaalin alkuar-
von ennalta depletoitujen (9 viikkoa OVX jälkeen) 1
vuotta vanhojen rottien reisien trabekulaarisessa
luussa, ja ne tekevät tämän yhtä tehokkaasti kuin
hPTH-(1-84)-NH₂. Samalla tavalla annoksia 0,6 nmoo-
30 lia/100 g ruumiinpainoa käytetään lisäkokeisiin.

- Täydellinen selitys protokollasta on annettu
julkaisuissa Rixon et al. J. Bone & Mineral Research
9, 1179 - 1189, 1994 ja Whitfield et al. Calcif. Tis-
sue Int. 58, 81 - 87, 1996, joita sisällytetään tähän
35 referenssinä. Normaalet, Sham-OVX (joista munasarjat
on poistettu), ja OVX Sprague-Dawley rottia (3 kuu-
kautta vanhoja; 255 - 260 g) hankitaan firmasta Char-

les River Laboratories (St. Constant, QC). Rotat jaetaan sattumanvaraisesti ryhmiin, joissa on 8 eläintä, jotka saavat Purina rotta ruokaa ja mielin määrin vettä. Ei tapahtunut yhtään ei aikatauluun mukaisia kuolemia. Eläimet saavat 6, injektiota kerran päivässä subkutaanisesti (ihon alaisesti)/viikko alkaen toisen viikon, OVX jälkeen, lopussa ja loppuen 8:n viikon lopussa, OVX jälkeen, (se on 36 injektiota). Kahdeksan Sham-OVX ja 8 OVX vertailu rottaa saavat 36 injektiota

5

10

vehikkeliä (0,15 M NaCl, jossa on 0,001N HCl) kun taas 8 OVX rottaa saavat 0,6 nmoolia fragmenttia vehikkelissä/100 g ruumiinpainoa). 8:n viikon lopussa OVX jälkeen, reisiluut poistetaan eristettään, puhdistetaan ja leikataan poikki keskiluunvarresta ja proksimaalinen puolikas hylätään. Sen jälkeen kun luun pääteosa

15

on poistettu, kukin puolireisiluu halkaistaan pituussuunnassa kahteen osaan ja luuydin huuhdotaan pois.

Fragmenttien luunrakentumisvoima määritetään trabikkeliin keskikipaksuuden (pinta-ala/ympärysmitta)

20

muutoksista eri hoidon saaneiden eläimien distaalisissa reisilupuolikkaissa. Keskitrabekulaarisen paksuuden mittaamiseksi, jokaisen rotan kummastakin deminaralisoidusta reisiluupuolikkaasta poistetaan vesi ja upotetaan parafiiniin. Jokaisesta luusta leikataan pituussuunnassa 10 µm leikkauksia keskitasosta ja värjätään tämän jälkeen Sandersonin nopealla luuvärillä (Surgipath Medical Industries, Inc., Winnipeg, MB, Canada). Keskitrabekulaarinen paksuus mitataan käyttämällä M4 kuvaussysteemiä ja luu morfometrasta ohjelmistoa firmasta Imaging Research Inc., (St. Catharines, ON, Canada).

25

30

Kuvassa 5 esitetään edustavia histologisia leikkauksia 8:n viikon lopussa OVX jälkeen preparoiduista. Tulokset esitetään lisäksi palkkien muodossa kuvassa 7. Palkit näyttävät arvoja trabekulaarisesta paksuudesta normaaleissa, munasarjat poistetuissa (OVX), sham, hPTH-(1-31)-NH₂, [Leu²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)-

35

hPTH(1-31)-NH₂ ja [Leu²⁷]syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH(1-31)-NH₂. [Leu²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ osoittaa erityisen erinomaisen tehon verrattuna lineaariseen analogiin, hPTH-(1-31)-NH₂. On osoitettu, että tämä lineaarinen analogi on täysin aktiivinen luun palauttamisessa, mutta käyttää ainoastaan yhtä solumaista merkinanto (AC-aktivoitua) reittiä. Siten näillä sykli-

5 sillä analogeilla samoin kuin niiden lineaarisilla analogeilla odotetaan olevan vähemmän ei toivottuja

10 klinisia sivuvaikutuksia kuin niiden pidemmällä vastineilla, kuten esim. hPTH-(1-34) tai hPTH-(1-84), jotka aktivoivat kumpaakin sellulaarista merkinantomekanismia.

Esimerkki 5

15 Luun palauttaminen hPTH analogien avulla rotissa, joilla on vakavasti depletoitunut trabekulaarinen luu

Tässä toisessa luun palauttamisesimerkissä, verrataan laktamien kyky palauttaa vaikeasti depletoitunutta trabekulaarista luuta. Tässä esimerkissä 6-

20 viikkoinen ohjelma, jossa nuorille sukukypsille rotille annetaan yksi injektio päivässä, jossa on 0,6 nmoolia peptidiä/100 g ruumiinpainoa lykätään 9:n viikon loppuun OVX jälkeen. Tällä kertaa 75 % niiden trabekulaarisesta luusta oli hävinnyt. Niin kuin kuvassa 6 on

25 esitetty [Leu²⁷]syklo[Glu²²-Lys²⁶]-hPTH-(1-31)NH₂ oli fragmenteista tehokkain. Se palautti trabekulaarisen luuvolymin normaalien kontrolliroottein arvoihin.

Esimerkki 6

30 hPTH analogien hypotensiivisiä vaikutuksia

Naaras Sprague-Dawley rottia (paino yli 290 g) nukutetaan vatsaontelonsisäisesti injektoidulla natriumpentobarbitaalilla (65 mg/kg ruumiinpainoa). Lämpötilaa peräsuolesta tarkastetaan YS1402 termistorilla (Yellow Springs Instrument Co., Inc. Yellow Springs, OH) ja pidetään välillä 36,0 - 38,5°C kokeen

35 aikana. Korvalehden lämpötilaa tarkastetaan myös käyt-

tämällä YSI banjo termistoria. Hännän valtimo paljastetaan kanyloidaan Jelco 25-g/V katetrilla (Johnson and Johnson Medical Inc., Arlington, TX) ja yhdistetään Stathampaine anturiin, jonka signaaleja tallennetaan digitaalisesti monitorilla Biopac Systems MP 100 Monitor (Harward Instruments, Saint Laurent, QC, Canada). PTH:n tai sen fragmenttien laskimonsisäistä injeksiota varten paljastetaan myös reisilaskimo. Leikkauksen jälkeen rottien annetaan vakaantua 8 min, jonka jälkeen PTH tai jokin sen fragmenteista (liuotettuna happamaksi tehtyyn suolaliuokseen, jossa on 0,001 N HCl) injektoidaan reisilaskimoon tai vatsan ihon alle. Tiedot kerätään 12 min laskimonsisäisen injektion jälkeen tai 22 min ihonalaisen injektion jälkeen. Kuvassa 8 esitetään verenpaineen lasku ja aika maksimilaskuun kun lisätään 0,8 nmoolia/100 g annos [Leu²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)hPTH-(1-31)-NH₂ tai [Leu²⁷]syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)hPTH-(1-31)-NH₂ annostettavaksi joko ihon alle (varjostamaton pylväs) tai laskimonsisäisesti (varjostettu pylväs). [Leu²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)hPTH-(1-31)-NH₂ analogi osoittaa lisääntyneen biokäyttökelpoisuuden verrattuna [Leu²⁷]syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)hPTH-(1-31)-NH₂. Tämän osoittaa, että tarvitaan paljon lyhyempi aika alentamaan minimi bp ihon alaisen injektion jälkeen. Kummatkin sykliset analogit osoittavat verrattuna hPTH-(1-31)-NH₂ lisääntyneitä hypotensiivisiä vaikutuksia kun niitä injektoidaan ihonalaisesti. Siten kunkin syklisen laktamianalogin, kun se injektoidaan ihon alle, odotetaan omaavan enemmän toivottuja ominaisuuksia kuin lineraarisella vastapuolella. Tämä käsittää suuremman biokäyttökelpoisuuden, joka on tulos lisääntyneestä vastuksesta proteaasia vastaan ja/tai lisättyneen kyvyn tulla siirretyksi lipidisestä ympäristöstä. Viimeksi mainittu voisi olla riippuvainen amfofiilisen helixin stabiloinnista lähellä hormonin C-päätettä.

Muita tuloksia:

Näitä tuloksia varten peptidit identifioidaan seuraavasti

- hPTH-(1-31)-NH₂ (1); [Leu²⁷]-hPTH-(1-31)-NH₂
 5 (2) (kuva 9); [Leu²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂
 (3) (kuva 2); [Leu²⁷]syklo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂
 (4); syklo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (5) (kuva 10);
 hPTH-(1-30)-NH₂ (6); [Leu²⁷]hPTH-(1-30)-NH₂ (7);
 [Leu²⁷]syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)NH₂ (8).
- 10 Adenylyylisyklaasiaktiviteetti. Aikaisemmin
 on esitetty, että [Leu²⁷]-hPTH-(1-34)-NH₂ on aktiivi-
 sempi stimuloadessaan AC aktiviteettia ROS solulinjas-
 sa kuin hPTH-(1-34)-NH₂⁵. On myös havaittu, että pepti-
 di 2 (EC₅₀ 11,5 ± 5,2 nM) on aktiivisempi kuin natiivi-
 15 nen sekvenssi 1 (EC₅₀ 19,9 ± 3,9 nM) (kuva 12). Pepti-
 dit 1 (·); 2 (□); 3 (Δ) 4 (▲) 5 (O). Laktamimuodostus
 Glu²² ja Lys²⁶ (3) välillä indusoi vielä suuremman AC-
 stimuloivan aktiviteetin, jonka EC₅₀ arvot ovat 3,3 ±
 0,3 nM (kuva 12). Siten tällä syklisaatiolla ja Lys²⁷:n
 20 korvaaminen Leu:lla nettovaikutus on n. 6-kertainen
 lisäys aktiviteettiin. Vastakohtana laktaamimuodostus
 joko Lys²⁶ ja Asp³⁰ (4) tai Lys²⁷ ja Asp³⁰ (5) välillä
 saa aikaan adenylyylisyklaasin stimulaation pienenty-
 25 misen suhteessa niiden alkuperäiseen lineaariseen sek-
 venssiin. Siten 26 - 30 laktamilla (4) on heikosti
 pienempi aktiviteetti kuin sen lineaarisella muodolla,
 EC₅₀ 17,0 ± 3,3 nM verrattuna 11,5 ± 5,2 nM (2) varten.
 27 - 30 laktami (5) vähentää vielä huomattavammin al-
 kuperäisen lineaarisen peptidin, jolla on EC₅₀ 40,3 ±
 30 4,4 nm, aktiviteettia verrattuna 19 ± 3,9 nM 1 varten
- Aikaisemmin on raportoitu, että hPTH-(1-30)-
 NH₂:lla (6) on AC-stimuloiva aktiviteetti (EC₅₀, 20
 nM), joka on lähempänä sen analogia 1. Nyt on havait-
 tu, että [Leu²⁷]-hPTH-(1-30)-NH₂:lla (7) ja syklo(Glu²²-
 35 Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂:lla (8) (kuva 11) on samanlainen
 AC-stimuloiva AC-aktiviteetti kuin peptidin 6 aktivi-
 teetti.

Hypotensiivisia vaikutuksia:

Kuvassa 13 on esitetty lineaaristen (6 ja 7) ja syklisten laktamianalogien (3 ja 8) hypotensiivinen vaikutus. On esitetty maksimi lasku verenpaineessa (ylempi), joka saadaan kun rottiin injektoidaan 0,8 mmoolia/100 g ruumiin painoa analogia ja aika, joka kuluu kunnes saadaan maksimilasku verenpaineeseen (alempi). Analogit (vasemmalta oikealle, peptidit 8, 7, 6, 3) injektoidaan joko laskimonsisäisesti (varjostettu pylväs) tai ihon alle (varjostamaton pylväs). Val³¹ poisto saa aikaan, että kaikilla analogeilla 6, 7 ja 8 on huomattavasti ($p < 0,05$) pienentynyt nopeus siirtää ihon alaisesti injektoitua peptidiä verisuonisysteemiin (kuva 13). Peptidien 6 ja 8 todellinen kokonaisverenpaineen lasku ei kuitenkin merkittävästi eroa ($p > 0,05$) muista analogeista, annettuna ihon alaisesti tai laskimonsisäisesti poikkeuksena peptidi 5.

Määrittäminen, joka korreloi hypotensiivisen vaikutuksen luoduttavan aktiviteetin kanssa.

Niin kuin esimerkissä 6 on esitetty ja kuvassa 8 on esitetty korreloi havaittu nopea hypotensiivinen vaikutus ihonalaisen hPTH analogien injektion jälkeen luutumisaktiviteetin kanssa. Tämän mukaisesti määrittäminen on käyttökelpoinen seulottaessa hPTH-analogiehdokkaita luoduttamisvaikutusta varten ja ei-hypotensiivisten rakenteiden eliminoimiseksi ilman että koe-eläimiä täytyy lopettaa.

Taustan avulla on käytetty uniikkia sarjaa luoduttavia ja ei-luoduttavia AC-, AC/PLC-, tai PLC-aktivoivia PTH-fragmentteja ratkaisevasti osoittamaan, että ainoastaan AC stimulaatio vähentää verenpainetta ja vertaamaan näiden fragmenttien hypotensiivista vaikutusta kun niitä injektoidaan ihonalaisesti tai laskimonsisäisesti naarasrottiin. Nyt on osoitettu, että ainoastaan AC- tai AC/PLC-stimuloivat fragmentit laukaisevat hypotensiivisen vasteen, ja että se on

ihonalaisen injektion suhteellisen pieni hypotensiivinen vaste eikä paljon suurempi vaste laskimonsisäiselle injektioille, joka korreloi hPTH-(1-31)NH₂, hPTH-(1-34), ja hPTH-(1-84) luuduttamisaktiviteetin kanssa OVX
 5 rotissa mutta ei hPTH-(1-30)NH₂ kanssa, joka stimuloi AC:a ja vähentää verenpainetta, mutta ei stimuloi luun muuodostusta.

Erityisesti, hPTH-(1-84) ja sen hPTH-(1-34), hPTH-(1-31)NH₂ ja hPTH-(1-30)NH₂ -fragmentit laskevat
 10 häntävaltimon painetta nukutetuissa Sprague-Dawley ro-
 tissa 42,4 - 67,1 % noin 1 minuutin sisällä injektion
 antamisen reisilaskimoon jälkeen mutta vähentää painetta vain 8,5 - 26,2 % 2 - 19 minuuttia ihonalaisen
 injektion jälkeen. hPTH-(1-84) ja hPTH-(1-34) stimuloi
 15 sekä adenylyylisyklaasia että fosfolipaasi-C:tä niiden
 kohdesoluissa, mutta hypotensiivinen vaikutus tulee olla stimuloitu erityisesti adenylyylisyklaasiaktiivatiolla, koska hPTH-(1-30)NH₂ ja hPTH-(1-31)NH₂, jotka
 voivat stimuloida ainoastaan adenylyylisyklaasia, ovat
 20 tehokkaasti hypotensiivisiä kun ne injektoidaan laskimonsisäisesti kun taas hPTH-(7-84), joka pystyy vain
 stimuloimaan fosfolipaasi-C:tä, ei ole merkitsevästi hypotensiivinen kun sitä injektoidaan laskimonsisäisesti.
 25 Koska PTH:n luuduttamisvaikutus myöskin välittyy adenyylisyklaasistimulaation kautta, odotetaan, että hypotensiivistä vastetta voitaisiin käyttää seulomaan uusia PTH-rakenteita mahdollista luuduttamista varten. Ihonalaisesti injektoitujen hPTH-(1-31)NH₂,
 hPTH-(1-34) ja hPTH-(1-84) luuduttamisvaikutus korreloi todella läheisesti niiden hypotensiivisten aktiiviteettien kanssa, hPTH-(1-34) ollessa paljon hypotensiivisempi hypotensiivisempi ja huomattavasti enemmän
 30 kui molemmat muut molekyylit. hPTH-(1-31)NH₂ ja hPTH-(1-84) ovat yhtä luuduttavia ja hypotensiivisiä. Kuitenkin tämä korrelaatio hajoaa hPTH-(1-30)NH₂:lla, joka
 35 stimuloi AC melkein vahvemmin kuin hPTH-(1-31)-NH₂ ja hPTH-(1-34) ja laskee verenpainetta yhtä paljon kuin

hPTH-(1-31)-NH₂ mutta ei stimuloi luun muodostusta. Kuitenkin kyky laskea valtimopainetta huomattavasti on luuduttavien PTH:n ja PTH-fragmenttien tavallinen ominaisuus ja on siten nopeasti määritettävissä oleva alustava mittari PTH-fragmenttien *in vivo* bioaktiiviteetista.

Erityisemmin sekä hPTH-(1-34) että hPTH-(1-31)-NH₂ ova maksimaalisesti hypotensiivisiä 0,8 nmoolia/100 ruumiinpainoa.

10 Tätä hypotensiivistä vastetta seuraa rottien korvien ja käpälien hetkellinen (20 - 30 min) punotus, mikä voidaan pitää käyttökelpoisena näkyvänä kvalitatiivisena merkinä.

15 Tätä hypotensiivistä vastetta seuraa rottien korvien ja käpälien hetkellinen (20 - 30 min) punotus, mikä voidaan pitää käyttökelpoisena näkyvänä kvalitatiivisena merkinä.

20 Vaikka AC- tai AC/PLC-stimuloivat fragmentit ovat voimakkaasti hypotensiivisiä kun niitä injektoidaan laskimonsisäisesti, laskimonsisäinen injektio, jossa on ainoastaan PLC:a hyvin hitaasti (9,8 ± 2,0 min) ja vain hyvin heikosti stimuloimaan pystyvää hPTH-(7-84) 0,8 nmoolia/100 g ruumiin painoa, laskee hännän valtimonpainetta 3,28 ± 1,0 mmHg verrattuna pikaiseen (0,9 ± 0,08 min) 43,2 ± 5,8 mmHg laskuun, jonka saa aikaan AC/PLC-stimuloiva hPTH-(1-84) tai yhtä pikaiseen 51,6 ± 3,3 mmHg laskuun, jonka aiheuttaa AC stimuloiva hPTH-(1-31)NH₂.

30 Yksi ihonalainen injektio AC- tai AC/PLC-stimuloivaa fragmenttia saa aikaan paljon hitaamman ja pienemmän laskun hännän valtimonpaineeseen kuin saman kokoinen laskimonsisäinen injektio. Esimerkiksi 0,8 nmoolia/100 ruumiin painoa hPTH-(1-34) laskee painetta ainoastaan 27,9 ± 3,6 mm Hg kun se injektoidaan ihonalaisesti verrattuna 50,9 ± 5,6 mm Hg kun se injektoidaan laskimonsisäisesti. Sama annos hPTH-(1-31)NH₂ laskee verenpainetta vain 11, 1 ± 1,6 mm Hg in-

jektoituna ihonalaisesti verrattuna $51,6 \pm 3,3$ mm Hg injektoituna laskimonsisäisesti.

Ei ole mitään huomattavaa eroa nopeiden ja suurien laskujen välillä hännän valtimon paineessa, joita saavat aikaan laskimonsisäisesti injektoidut hPTH-(1-84), hPTH-(1-34) ja hPTH-(1-31)NH₂, mutta hPTH-(1-34) on ainakin kaksi kertaa tehokkaampi ($P < 0,01$) kuin molemmat muut molekyylit kun sitä injektoidaan ihonalaisesti.

Yksi tekijöistä, joka vaikuttaa ihonalaisesti injektoitujen PTH tai PTH-fragmenttien hypotensiiviseen tehoon ja luoduttamisvaikutukseen on sen kyky liikkua injektiopaikalta kohteisiinsa ensiksi verisuonistoon ja tämän jälkeen luihin ilman että se inaktivoituu. Tämä kyky heijastuu aikana, joka injektion jälkeen vaaditaan hännän valtimopaineen laskemiseksi minimiarvoonsa. PTH molekyylin lyhentäminen C-päässä 84:nestä 31:een tähteeseen poistaa kyvyn stimuloida PLC:a ilman, että kykyä stimuloida AC:a pienee ja se lyhentää aikaa, jota tarvitaan hännän valtimopaineen saamiseksi minimiinsä yhdeksän kertaa. Poistamalla vielä yksi tähde hPTH-(1-30)NH₂:in valmistamiseksi lisää dramaattisesti aikaa, joka vaaditaan verenpaineen laskemiseksi minimiinsä $2,0 \pm 0,31$ minuuttista tapauksessa hPTH-(1-31)NH₂ $13,8 \pm 2,3$ minuuttiin. Kuitenkin on tärkeätä havaita, että hPTH-(1-31)NH₂:in ei kestänyt pidempää alentaa verenpainetta kuin hPTH-(1-84).

Esillä olevassa keksinnössä hPTH-(1-31)NH₂ käyttö, ensimmäinen PTH rakenne, joka pystyy stimuloimaan AC:ia vahvemmin kuin hPTH-(1-34) ilman että PLC aktivoituu ja membraaniin yhdistynyt PKCs aktiviteetti stimuloituu, on nyt antanut suurimman suoran todisteen että PTH:in hypotensiivinen vaikutus riippuu kokonaan AC aktivaatiosta. Siksi vaikkakin laskimonsisäisesti injektoituna 0,8 nmoolia ruumiin painosta hPTH-(7-84), joka voi stimuloida vain PLC/PKCs:a; ei merkittävästi

vaikuta hännän valtimopaineeseen, saman suuruinen laskimonsisäisesti injektoitu annos hPTH-(1-31)NH₂ laskee verenpainetta yhtä paljon kuin hPTH-(1-34).

Koska AC myös välittää PTH-indusoitua stimulaatiota kuori- ja trabekulaariluun muodostuksessa OVX rotissa hypotensiivisen vasteen laukaisu koskemattomissa naarasrotissa tuntuu olevan yksinkertaista, nopeasti mitattavissa oleva indikaattori PTH rakenteen mahdollisesta luun muodostumisesta. Toisaalta epäonnistuminen alentaa valtimoverenpainetta poistaisi osan muulta arvioinnilta, siten välttyttäisiin tarpeettomilta, kalliilta, pitkäaikaisilta luuduttamiskokeilta OVX rotissa. Hypotensiivinen vaste PTH:n laskimonsisäiselle injektioille ei korreloitu luuduttamiseen. Kuitenkin paljon pienempi hypotensiivinen vaste ihonalaisesti injektoidulle hPTH-(1-31)NH₂, hPTH-(1-34) ja hPTH-(1-84) kulkee rinnakkain näiden molekyylien luun muodostuksen kanssa, jossa hPTH-(1-34):lla on vahvimmat hypotensiiviset ja luunmuodostavat vaikutukset ja molempien muiden molekyylien ollessa yhtä tehokkaita kuin muut, mutta vähemmän tehokkaita kuin hPTH-(1-34), vähentämällä verenpainetta ja stimuloidessa luun muodostusta. Mutta tämä korrelaatio hajoaa hPTH-(1-30)NH₂:illa, joka stimuloi AC:a melkein yhtä vahvasti kuin hPTH-(1-31)NH₂ ja hPTH-(1-34) ja alentaa verenpainetta yhtä paljon kuin hPTH-(1-31)NH₂ mutta ei stimuloi luun muodostusta¹¹. Syy tähän luun muodostuspuutokseen on tuntematon. Se ei voi olla riippuvainen ihonalaisesti injektoidusta hPTH-(1-30)NH₂:sta, joka vaatii enemmän aikaa alentaa verenpainetta, koska ihonalaisesti injektoidu hPTH-(1-84) tarvitsee yhtä pitkän ajan alentaa verenpainetta, kuitenkin on vahvasti luunmuodostava. Luunmuodostusvaste on selvästi riippuvainen monesta eri tekijästä, jotka yhtyvät mahdollistamaan tarpeeksi vaikuttavan hormonin tai hormonifragmenttien tulon injektiokohdasta kohde PTH reseptoriin-ilmentäen kypsiä osteoblasteja. AC-

stimulaation puute, verenpainetta laskeva PTH-(1-30)NH₂ luun muodostuksen stimuloimiseksi voi olla tulos suuremman instabiliteetin yhdistelmästä, hieman korkeammasta EC₅₀ AC stimulaatiota varten, so 20 nM 16 nM sijasta hPTH-(1-31)NH₂ ja hPTH-(1-34) varten ja pitkä aika saapua verenkiertoon injektio kohdasta.

Vaikkakin hPTH-(1-30)NH₂ puute olla luuduttava, kyky merkittävästi alentaa valtimon painetta on vielä luuduttavan PTHs:n tavallinen ominaisuus ja on siksi nopeasti määritettävissä oleva mahdollisten PTH-fragmenttien *in vivo* bioaktiiviteetin indikaattori. Tästä seuraa, että hypotensiivisen vasteen tulisi myös toimia luuduttavan PTH rakenteen kyvyn tehokkaana indikaattorina saavuttaa kohteitansa oraalisen tai muun ei injektoidun annostuksen jälkeen.

Hypotensiivisen reaktion epämukavuus ja muut mahdolliset jälkiseuraukset jokaista injektiota vastaan voi rajoittaa osteoporoottisten potilaiden halukkuutta vastaanottaa pitkäaikaista hoitoa PTH tai PTH-fragmentilla. Onneksi käytetään yleisesti ajoittaisia PTH:en ihonalaisia injektioita luun muodostuksen stimulointiin ja nämä molekyylit ovat kaikki hyvin paljon vähemmän hypotensiivisiä kun ne injektoidaan ihonalaisesti kuin kun ne injektoidaan laskimonsisäisesti. Kuten myös aikaisemmin on esitetty ^{6,7}, hPTH-(1-31)NH₂:lla on lisäksi etu stimuloida AC:a ilman että se stimuloi PLC:a ja mitä tahansa potentiaalista Ca²⁺ - ja PKCs välittämää sivuvaikutusta, jonka se voi laukaista.

Esimerkki 7

Cyclo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (5). Synteesi tehdään analogisella tavalla [Leu²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)NH₂ synteesin kanssa. Tuoteella on arvioitu puhtaus > 95%, molekyylimassa, joka on 3700,64 (±0,38) (odotettu M + 1 = 3700,14). Peptidi sekventoidaan laktamikohtaan vahvistamiseksi.

[Leu²⁷]-syklo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂ (8). Tämä peptidi syntetisoidaan kuten peptidi 3, ilman kä-

sin tukeen lisättyä Val. Tuotteella on arvioitu puhtaus $> 97\%$, molekyylimassa, joka on $3586,14 \pm 0,19$ (odotettu $M+1 = 3685,99$).

Esillä olevan keksinnön mukaiset analogit voidaan annostaa lämminveriselle nisäkkäälle, joka on sen tarpeessa, erityisesti ihmiselle parenteraalisesti, topikaalisesti tai rektaalisesti tai inhalaation kautta tai oraalisella antotavalla. Tavanomaisesti analogit voidaan valmistaa parenteraalisessa annostusmuodossa, jossa on 1 - 300 mg yksikköannosta kohden yhdessä tavanomaisen vehikkelin, täyteaineen, sideaineen, säilöntäaineen, stabiloivan aineen, väriaineen, vaikuttavan aineen ja sen tapaisen kanssa, kuten vaaditaan hyväksytyssä farmaseuttisessa käytännössä

Parenteraalista antoa varten tulee antaa 1 - 2 ml:a kivuttomana ihonalaisena injektiona ultrahienon 30 mittaruiskun neulan läpi ei enemmän kuin kerran päivässä, yhdestä kahteen vuoteen, riippuen sairauden vaikeusasteesta. Injektoitu aine voi sisältää jonkin esillä olevan keksinnön mukaisista aineista vesipitoisena, isotonisena, steriilinä liuoksena tai valinnaisesti säilöntäaineen kuten esim. fenoli tai liuottavan aineen, kuten esim. etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA)) kanssa. Näiden hyväksyttävien vehikkelien ja liuottimien joukkoon, joita voidaan käyttää kuuluu vesi, heikosti happamaksi tehty vesi, Ringerin liuos ja isotoninen natriumkloridiliuos. Lisäksi käytetään tavallisesti steriilejä, kiinteitä öljyjä tai suspendoivia aineita. Synteettisiä monoglyseridejä, diglyseridejä, rasvahappoja (kuten esim. oleiinihappoa) käytetään tavallisesti kiinteänä öljynä valmistettaessa ruiskutettavia aineita.

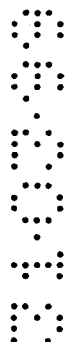
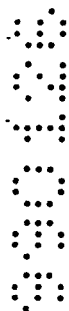
Rektaalista antoa varten esillä olevan keksinnön mukaiset analogit voidaan valmistaa suppojen muodossa sekoittamalla sopivan ei-ärsyttävän täyteaineen kanssa kuten esim. kaakaovoin tai polyetyleniglykolien kanssa.

Iholla käyttöä varten esillä olevan keksinnön
mulaiset analogit voidaan valmistaa voiteiden, hyyte-
löiden, liuoksien, suspensioiden tai ihoon tarttuvina
laastareina.

- 5 Inhalaatiota varten, tämä voidaan saada ai-
kaan esimerkiksi välineillä, joita on esitetty PCT
julkaisussa WO94/07514.

- Päivittäisten annosten ei tulisi ylittää 0,05
mg/kg ruumiin painoa tai n. 3,5 mg/70 kg ihminen,
10 riippuen nimenomaisen yhdisteen tehosta, hoidettavan
kohteen iästä, sukupuolesta ja kunnosta. Kuten hyvin
tiedetään määrä vaikuttavaa ainetta, joka voidaan yh-
distää kantavien aineiden kanssa yksittäisen annoksen
valmistamiseksi vaihtelee riippuen käsiteltävästä
15 isännästä ja antotavan erityisestä muodosta.

Seuraavassa on luettelo analogeista, joita
kaikkia voidaan valmistaa edellä mainituilla menetel-
millä.



Taulukko 1 PTH-analogien molekyyli массыja

SEQ ID	ANALOGI	MASSA (MÄÄRITETTY)	MASSA (ODOTETTU) (M + 1)
1	hPTH-(1-31)-NH ₂	3717,77 (±0,13)	3717,14
3	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3685,46 (±0,46)	3685,12
7	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-30)-NH ₂	3586,14 (±0,19)	3585,99
4	[Leu ²⁷]syklo(Lys ²⁶ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3685,61 (±0,36)	3685,12
6	syklo(Lys ²⁷ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3700,64 (±0,38)	3700,14
8	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)hPTH-(1-31)-OH	3685,96 (±0,07)	3686,12
9	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-NH ₂	4083,62 (±0,33)	4083,52
10	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-OH	4084,14 (±0,87)	4084,52
11	[Ala ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3642,70 (±0,76)	3643,04
12	[Nle ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684,57 (±0,99)	3685,12
13	[Nle ^{8,18} ;Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3649,50 (±0,59)	3649,04
14	syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3699,66 (±0,49)	3700,14
15	[Ile ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684,76 (±0,74)	3685,12
16	[Tyr ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3734,47 (±0,80)	3735,14
17	α-asetyyli-[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3726,25 (±0,42)	3717,12
18	[Leu ²⁷]syklo(Lys ²² -Glu ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684,67 (±0,52)	3685,12
19	[Leu ²⁷]syklo(Asp ²² -Orn ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3656,90 (±0,67)	3657,12
20	[Cys ²² ;Cys ²⁶ ;Leu ²⁷]syklo(Cys ²² -Cys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3651,26 (±0,31)	3650,1
21	[Cys ²⁶ ;Cys ³⁰ ;Leu ²⁷]syklo(Cys ²⁶ -Cys ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3663,61 (±0,16)	3664,13

Taulukko 2 Peptidianalogien adenyylisyklaasi (AC) tehot

SEQ ID	ANALOGI	ADENYYLISYKLAASI (EC ₅₀)
1	hPTH-(1-31)-NH ₂	20
3	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3
7	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-30)-NH ₂	20
4	[Leu ²⁷]syklo(Lys ²⁶ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3*, 17**
6	syklo(Lys ²⁷ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	40
8	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)hPTH-(1-31)-OH	7
9	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-NH ₂	8
10	[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-OH	6
11	[Ala ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
12	[Nle ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
13	[Nle ^{8,18} ;Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	6
14	syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	17
15	[Ile ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
16	[Tyr ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
17	α-asetyyli-[Leu ²⁷]syklo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	24
18	[Leu ²⁷]syklo(Lys ²² -Glu ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	4
19	[Leu ²⁷]syklo(Asp ²² -Orn ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	> 200
20	[Cys ²² ;Cys ²⁶ ;Leu ²⁷]syklo(Cys ²² -Cys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	16
21	[Cys ²⁶ ;Cys ³⁰ ;Leu ²⁷]syklo(Cys ²⁶ -Cys ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	24

*Fig. 4

**Fig. 12

Lähdeviitteet

Seuraavien lähdeviitteiden selitykset on liitetty tähän referensseiksi.

(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.; Keutman, 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) Surewics, 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.; Willic, G.E.; Ross, V.; Barbier, J.R.; Isaacs, R.j.; Ohannes-sianbarry, L. Stimulation of the Growth of Femoral Trabecular Bone in Ovarieectomized Rats by the Novel Parathyroid Hormone Fragment, hPTH-(1-31)NH₂ (Ostabo-lin) Calcif. Tissue Int. 1996, 58, 81 - 87.

(7) Whitfield, J.F.; Morley, P. Small Bone-Building Fragments of Parathyroid Hormone: New Thera-peutic Agents for Osteoporosis Trends Pharmacol. Sci. 1995 16, 382 - 386.



SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISET TIEDOT:

(i) HAKIJA:

- (A) NIMI: National Research Council of Canada
- (B) KATU: Intellectual Property Services
Montreal Road, Bldg. M-58,
Room EG-12
- (C) KAUPUNKI: Ottawa
- (D) OSAVALTIO: Ontario
- (E) MAA: Canada
- (F) POSTINUMERO TAI KOODI: K1a 0R6

(ii) KEKSINNÖN NIMITYS: LISÄKILPIRAUHASHORMONIANALOGEJA
OSTEOPOROOSIN HOITAMISEKSI

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 33

(iv) KONEKODIMUOTO:

- (A) VÄLINETYYPPI: Levyke
- (B) TIETOKONE: IBM PC yhteensopiva
- (C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
- (D) OHJELMISTO: PatentIn Release #1.0,
Versio #1.30

(v) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:

- (A) HAKEMUSNUMERO: PCT/CA97/00547
- (B) JÄTTÖPÄIVÄ: 01-AUG-1997

(vi) PRIORITEETTIHAKEMUKSEN TIEDOT:

- (A) HAKEMUSNUMERO: 08/691,647
- (B) JÄTTÖPÄIVÄ: 02-AUG-1996

(2) SEKVENSSIN ID NO: 1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 31 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 1:

Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn	Leu	Gly	Lys	His	Leu	Asn
1				5					10					15	

Ser	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val
			20				25						30	

(2) SEKVENSSIN ID NO: 2 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 31 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo

- (C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSsin KUVaus: SEQ ID NO: 2:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

(2) SEKVENSsin ID NO: 3 TIEDOT:

- (i) SEKVENSsin OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 31 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSsin KUVaus: SEQ ID NO: 3:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

(2) SEKVENSsin ID NO: 4 TIEDOT:

- (i) SEKVENSsin OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 31 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSsin KUVaus: SEQ ID NO: 4:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Mete Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

(2) SEKVENSsin ID NO: 5 TIEDOT:

- (i) SEKVENSsin OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 31 aminohappoa
(B) TYYPPI: aminohappo
(C) JUOSTEISUUS:
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(ix) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO 5:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 6 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 31 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 6:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 7 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 30 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 7:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 8 TIEDOT

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 31 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS.

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 8:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

(2) SEKVENSSIN ID NO: 9 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 34 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 9:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

(2) SEKVENSSIN ID NO: 10 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 34 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 10:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

(2) SEKVENSSIN ID NO: 11 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 31 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 11:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 12 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 31 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 12:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 13 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 31 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 13:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 14 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 31 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 14:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 15 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 31 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 15:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 16 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 31 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 16:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 19 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 31 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 19:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 20 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 31 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 20:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 21 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 31 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: renkaanmuotoinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 21:

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

(2) SEKVENSSIN ID NO: 22 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 34 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 22:

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
20 25 30
Asn Phe

(2) SEKVENSSIN ID NO: 23 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 31 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 23:

Xaa Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Glu Arg Val Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa
20 25 30

(2) SEKVENSSIN ID NO: 24 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 4 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 24:

Val His Asn Xaa
1

(2) SEKVENSSIN ID NO: 25 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 5 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS:

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 25:

Val His Asn Phe Xaa
1 5

(2) SEKVENSSIN ID NO: 26 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 6 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 26:

Val His Asn Phe Val Xaa
1 5

(2) SEKVENSSIN ID NO: 27 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 7 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 27:

Val His Asn Phe Val Ala Xaa
1 5

(2) SEKVENSSIN ID NO: 28 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 8 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 28:

Val His Asn Phe Val Ala Leu Xaa

1

5

(2) SEKVENSSIN ID NO: 29 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 4 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 29:

His Lys Lys Lys

1

(2) SEKVENSSIN ID NO: 30 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 4 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 30:

His Leu Lys Lys

1

(2) SEKVENSSIN ID NO: 31 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 4 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 31:

Lys Lys Lys Lys

1

(2) SEKVENSSIN ID NO: 32 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 4 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo

- (C) JUOSTEISUUS:
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 32:

His Leu Lys Ser
1

(2) SEKVENSSIN ID NO: 33 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 5 aminohappoa
 - (B) TYYPPI: aminohappo
 - (C) JUOSTEISUUS:
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: peptidi

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NO: 33:

Val Leu Asn Phe Xaa
1 5

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH-(1-31) analogi, jossa aminohappo 27 on Lys tai on substituoitu hydrofobisella jäännöksellä, ja joka on syklisoitu kuten välillä Glu22 ja Lys26 laktaamin muodostamiseksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen analogi, jossa hydrofobinen jäännös on Leu (SEQ ID NO:3).

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen analogi, jossa hydrofobinen jäännös on valittu seuraavista: Ile, Nle, Met, ja α -aminobutyyrihappo.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen analogi, jolla on C-terminaalihamidi- tai C-terminaalikarboksyyliryhmä.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen analogi, jolla on SEQ ID NO: 3.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen analogi, jolla on SEQ ID NO: 14.

7. Koostumus, joka käsittää jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukaisen analogin yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai täyteaineen kanssa.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukaisen analogin käyttö terapiassa.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukaisen analogin käyttö lääkkeen valmistamiseksi osteoporoosin hoitoon.

10. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH analogi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat, joilla on aminohapposekvenssi:

H-NH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-R3-R4-R5-R6-Met-Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-R11-Leu-Gln-Asp-NH₂ (SEQ ID NO:33)

jossa

R3=His tai vesiliukoinen aminohappo,

R4=Leu tai vesiliukoinen aminohappo,

R5=Asn tai vesiliukoinen aminohappo,

R6=Ser tai vesiliukoinen aminohappo,

R11 =Lys tai Leu,
syklisoitu laktaamin muodossa aminohappopari-
en 22 ja 26; 26 ja 30; tai 27 ja 30 välillä kun R11 on
Lys, sillä ehdolla, että analogi ei ole SEQ ID NO:7.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen analogi,
jossa syklisaatio on joko Glu²²:n ja Lys²⁶:n välillä tai
Lys²⁶:n ja Asp³⁰:n välillä.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen analogi,
jossa R3 on His tai Lys, R4 on Leu, Lys tai Arg, R5 on
Asn, Om, Hci, Asp, Arg, Lys, D-Lys, Ser tai Gly, ja R6
on Ser, Lys, Asp tai Arg.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen analogi,
jossa R3-R6 on His-Lys-Lys-Lys, His-Leu-Lys-Lys, Lys-
Lys-Lys-Lys tai His-Leu-Lys-Ser (SEQ ID NOS: 28-31).

14. Koostumus annettavaksi lämminveriselle
eläimelle käsittäen ihmisen, joka koostumus sisältää
patenttivaatimuksen 10 mukaisen ihmisen lisäkilpi-
raushormoni analogin yhdessä farmaseuttisesti hyväk-
syttävän kantajan tai täyteaineen kanssa.

15. Menetelmä osteoporoosin hoitamiseksi hoi-
don tarpeessa olevalla lämminverisellä eläimellä, kä-
sittäen terapeuttisesti tehokkaan määrän annon patent-
tivaatimuksen 10 mukaista ihmisen lisäkilpirauhashor-
monianalogia tällaiselle lämminveriselle eläimelle.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetel-
mä, jossa ihmisen lisäkilpirauhashormoni analogi on
syklisoitu kuten laktaami aminohappoparien 22 ja 26
välillä.

17. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH ana-
logi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat,
joilla on aminohapposekvenssi:

H-NH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-
Leu-Gly-Lys-R3-R4-R5-R6-Met-Gl-u-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-
Arg-Lys-R11-Leu-Gln-Asp-OH (SEQ ID NO:33)

jossa

R3=His tai vesiliukoinen aminohappo,

R4=Leu tai vesiliukoinen aminohappo,

R5=Asn tai vesiliukoinen aminohappo,
 R6=Ser tai vesiliukoinen aminohappo,
 R11=Lys tai Leu,
 syklisoitu laktaamin muodossa aminohappopari-
 en 22 ja 26; 26 ja 30; tai 27 ja 30 välillä kun R11 on
 Lys.

18. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH ana-
 logi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat,
 joilla on aminohapposekvenssi:

H-NH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-
 Leu-Gly-Lys-R3-R4-R5-R6-Met-Glu-Arg-Val-R8-Trp-Leu-
 Arg-R10-R11-Leu-Gln-R13-NH₂ (SEQ ID NO:33)

jossa

R3=His tai vesiliukoinen aminohappo,

R4=Leu tai vesiliukoinen aminohappo,

R5=Asn tai vesiliukoinen aminohappo,

R6=Ser tai vesiliukoinen aminohappo,

R8=Cys tai Glu

R10=Cys,

R11=Lys tai Leu,

R13=Asp tai Cys

syklisoitu disulfidisillan muodossa Cys pari-
 en 22/26 tai 26/30 välillä.

19. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH ana-
 logi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat,
 joilla on aminohapposekvenssi:

H-NH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-
 Leu-Gly-Lys-R3-R4-R5-R6-Met-Glu-Arg-Val-R8-Trp-Leu-
 Arg-R10-R11-Leu-Gln-R13-OH (SEQ ID NO:34)

jossa

R3=His tai vesiliukoinen aminohappo,

R4=Leu tai vesiliukoinen aminohappo,

R5=Asn tai vesiliukoinen aminohappo,

R6=Ser tai vesiliukoinen aminohappo,

R8=Glu tai Cys

R10=Cys

R11=Lys tai Leu

R13=Asp tai Cys
syklisoitu disulfidisillan muodossa Cys pari-
en 22/26 tai 26/30 välillä.

20. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH ana-
logi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat,
joilla on aminohapposekvenssi:

H-NH-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-
Leu-Gly-Lys-R3-R4-R5-R6-Met-Glu-Arg-Val-R8-Trp-Leu-
R9-R10-R11-Leu-R12-R13-NH₂ (SEQ ID NO:35)

jossa

R3=His tai vesiliukoinen aminohappo,

R4=Leu tai vesiliukoinen aminohappo,

R5=Asn tai vesiliukoinen aminohappo,

R6=Ser tai vesiliukoinen aminohappo,

R8=Lys, Asp, Cys, Orn tai Glu,

R9=Arg, Cys, Lys, Orn, His tai Glu

R10=Glu, Orn, Cys, Asp tai Lys,

R11 =Lys, Gln, Ile, Nle, Leu, Tyr, Ala tai

Asp,

R12=Gln, Glu, Asp, Lys tai Orn ja

R13=Asp, Glu, Orn tai Lys

syklisoitu laktaamin muodossa aminohappopari-
en 22 ja 26; 26 ja 30; tai 27 ja 30 välillä kun R11 ja
R13 ovat Lys tai Asp; tai 25 ja 29 kun R9 ja R12 ovat
Lys, Orn, Glu tai Asp, tai syklisoitu disulfidisillan
muodossa Cys parien 22/26 tai 26/30 välillä, sillä eh-
dolla että analogi ei ole SEQ ID NO:7.

21. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH ana-
logi tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat,
jolla on aminohapposekvenssi SEQ ID NO:7.

22. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni analogin,
jolla on aminohapposekvenssi SEQ ID NO:7 käyttö lää-
keen valmistamiseksi osteoporoosin hoitamiseksi täl-
laisen hoidon tarpeessa olevalla lämminverisellä eläi-
mellä.

23. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH-(1-
31) analogi, jossa paikka 27 on Lys tai on substituoit-

tu seuraavilla: Ala, Tyr tai Gln, ja joka on syklisoitu Glu²² ja Lys²⁶ välillä laktamin muodostamiseksi.

24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen analogi, jolla on joko C-terminaaliamidipääte tai C-terminaalikarboksyylipääte.

25. Koostumus annettavaksi sen tarpeessa olevalle lämminveriselle eläimelle, joka koostumus sisältää patenttivaatimuksen 23 mukaisen ihmisen lisäkilpirauhashormoni (hPTH)-(1-31) analogin yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai täyteaineen kanssa.

26. Patenttivaatimuksen 23 mukaisen ihmisen lisäkilpirauhashormoni (hPTH)-(1-31) analogin käyttö lääkkeen valmistamiseksi lämminverisen eläimen hoitamiseksi, joka tarvitsee tällaista hoitoa.

27. Ihmisen lisäkilpirauhashormoni hPTH analogi ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat, joilla on aminohapposekvenssi

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 (SEQ ID NO: 23) jossa,

R=vety,

R1=Ser,

R2=Met,

R3=His tai Lys,

R4=Leu tai Lys,

R5=Asn tai Lys,

R6=Ser tai Lys,

R7=Met,

R8=Glu tai Lys,

R9=Arg,

R10=Glu tai Lys, sillä ehdolla että R8 ja R10 eivät ole molemmat Glu ja eivät ole molemmat Lys,

R11=Lys tai Leu,

R12=Gln, X=OH, tai NH₂, ja Y=Val-X (SEQ ID NO: 36), Val-His-X (SEQ ID NO: 37), Val-His-Asn-X (SEQ ID NO: 38) tai Val-His-Asn-Phe-X (SEQ ID NO: 24) sykli-

soitu laktaamin muodossa aminohappoparien 22 ja 26 välillä, lukuun ottamatta kun $R=H$, $R1=Ser$, $R2=Met$, $R3=His$, $R4=Leu$, $R5=Asn$, $R6=Ser$, $R7=Met$, $R8=Glu$, $R9=Arg$, $R10=Lys$, $R11=Leu$, $R12=Gln$, $X=OH$ tai NH_2 , ja $Y=Val-X$ yhdessä.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen analogi, jossa laktaami on Glu22-Lys26 laktaami.

29. Patenttivaatimuksen 27 mukainen analogi, jossa R on H ja X on NH_2 .

30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen analogi, jossa $R2$ on Met , $R7$ on Met , $R8$ on Glu , ja $R10$ on Lys .

31. Patenttivaatimuksen 30 mukainen analogi, jossa $Y=Val-X$.

32. Patenttivaatimuksen 30 mukainen analogi, jossa $Y=Val-His-Asn-Phe-X$ (SEQ ID NO:24).

33. Analogi, jolla on SEQ ID NO: 9.

34. Analogi, jolla on SEQ ID NO: 10.

35. Analogi, jolla on SEQ ID NO: 11.

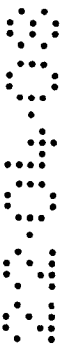
36. Analogi, jolla on SEQ ID NO: 13.

37. Analogi, jolla on SEQ ID NO: 14.

38. Analogi, jolla on SEQ ID NO: 16.

39. Analogi, jolla on SEQ ID NO: 18.

40. Analogi, jolla on SEQ ID NO: 19.



1/15

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-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-COOH

Fig. 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-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 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-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 3

2/15

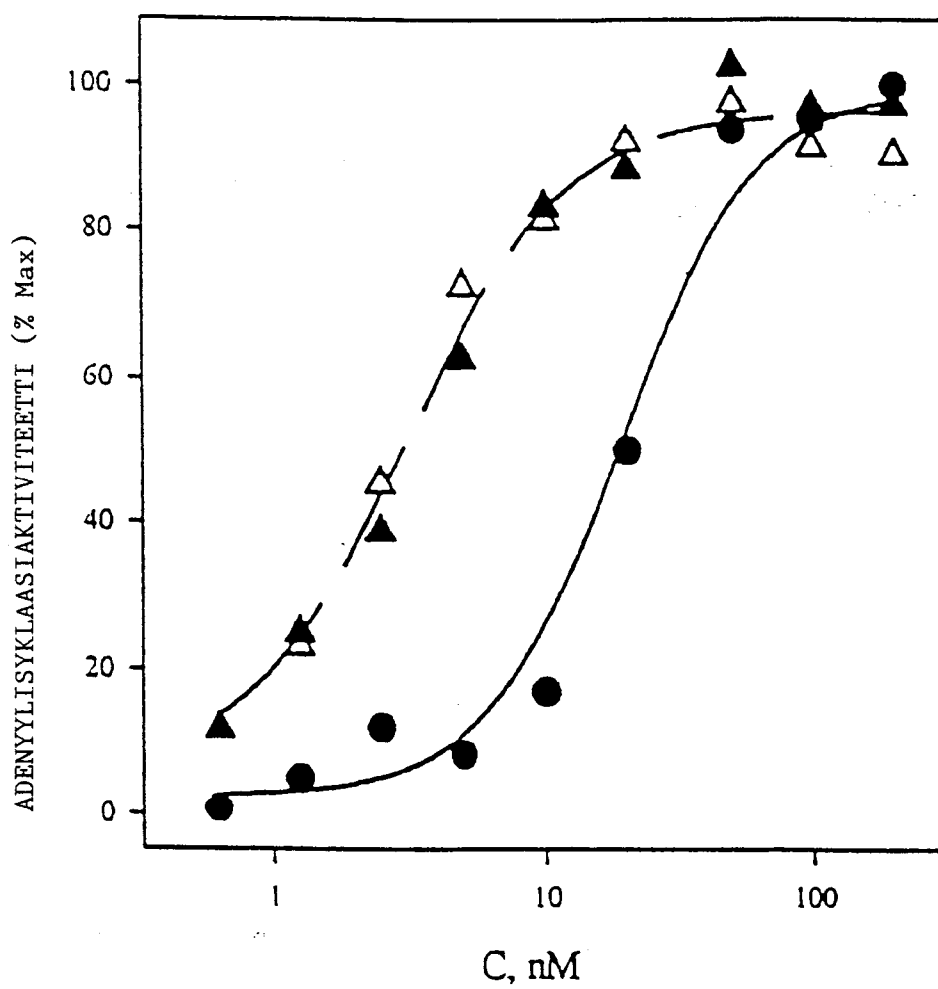


Fig. 4

3/15

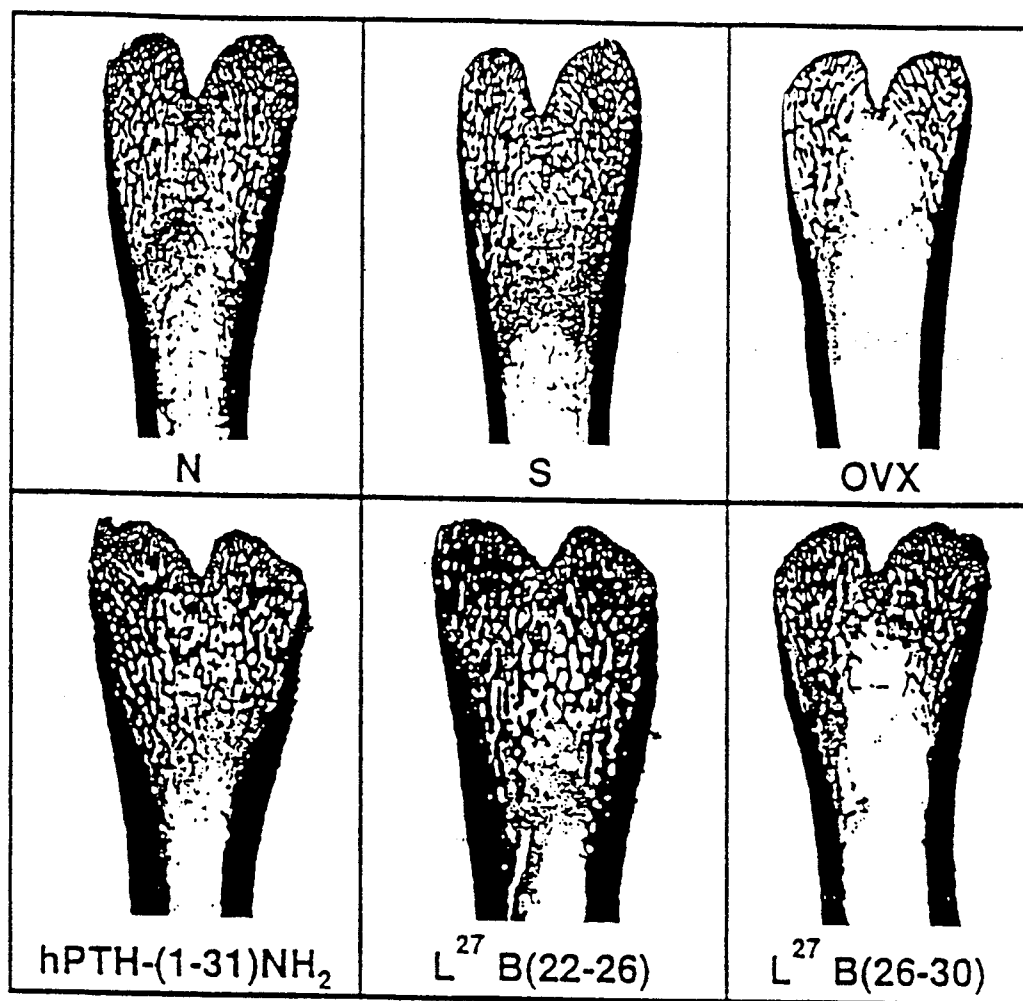


Fig. 5

4/15

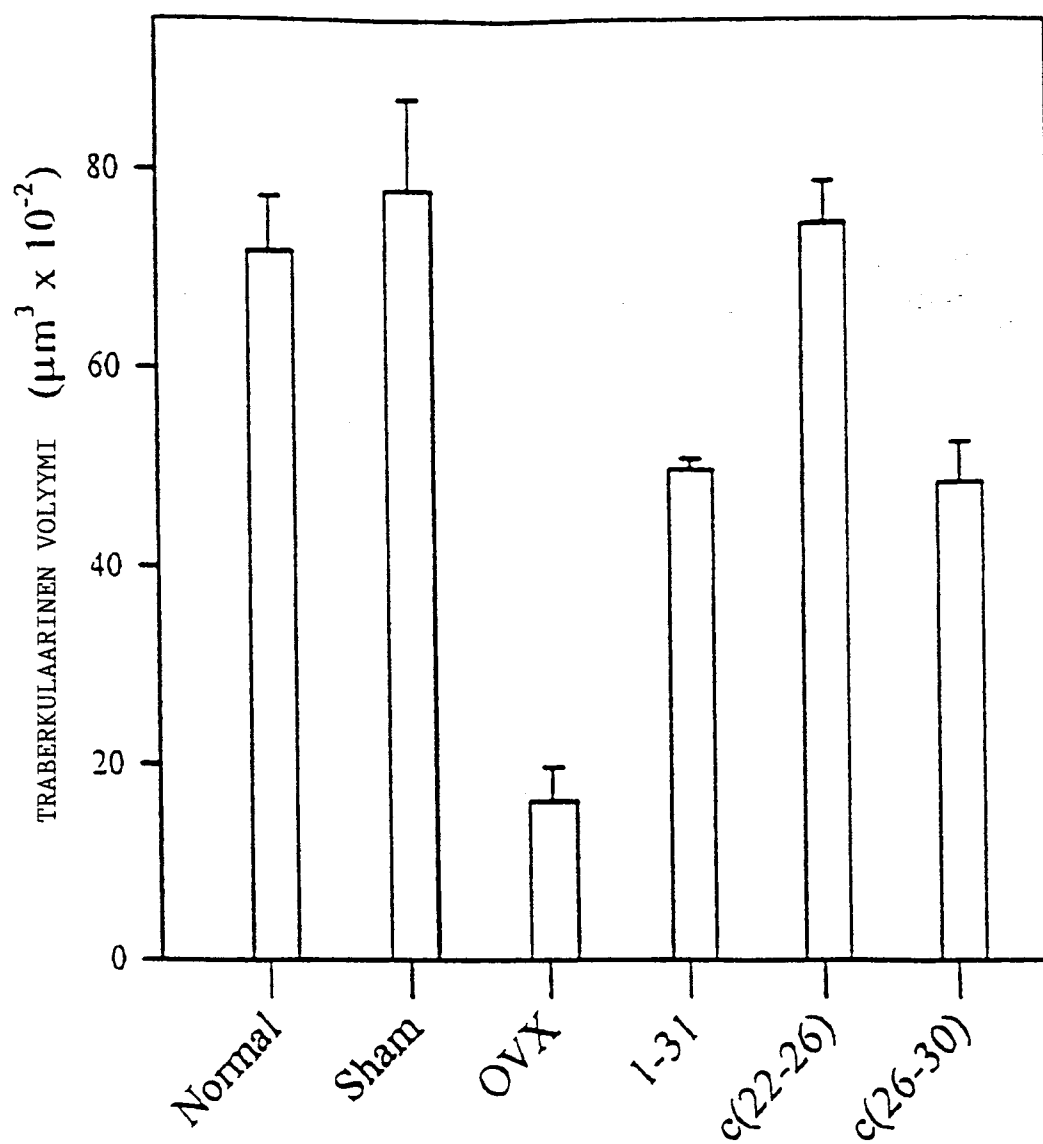


Fig. 6

5/15

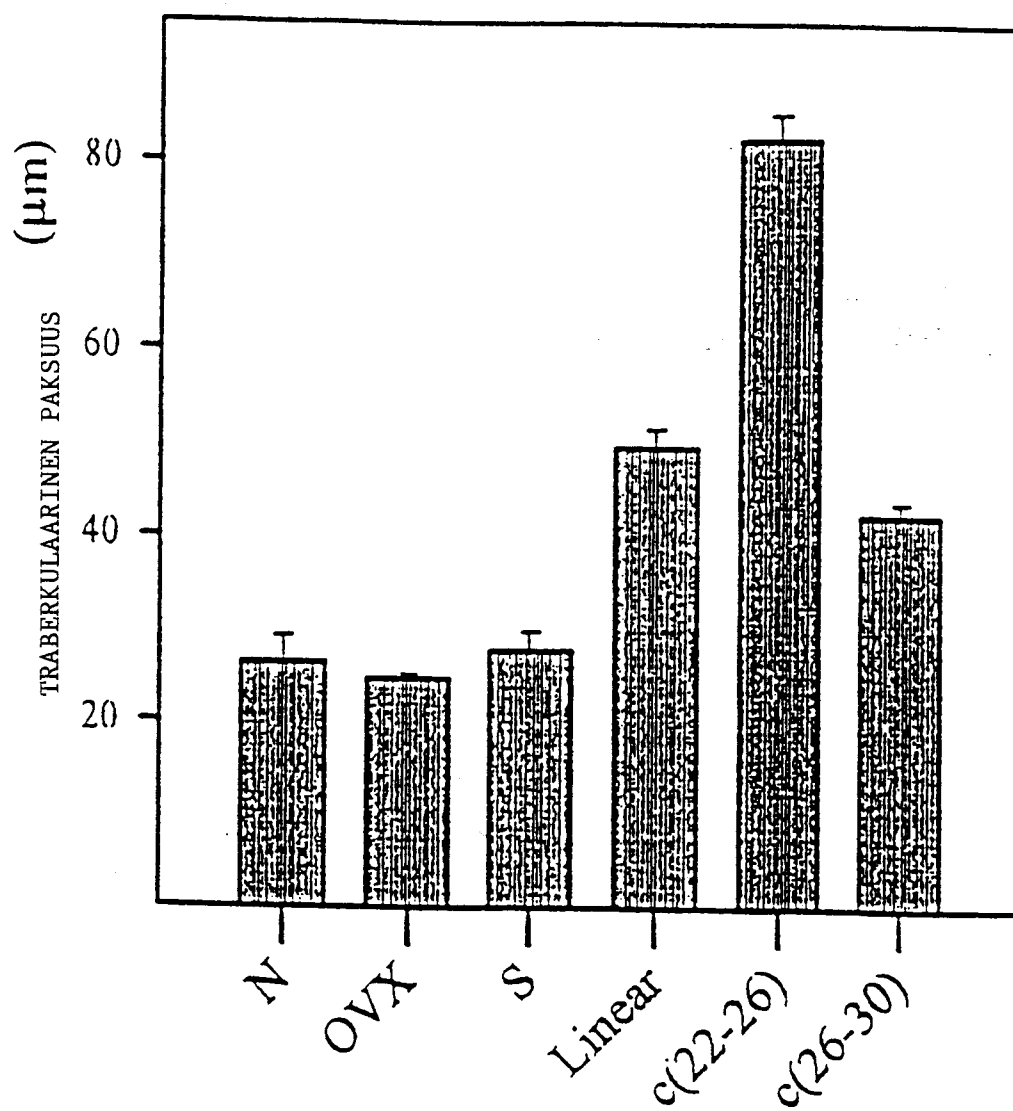


Fig. 7

6/15

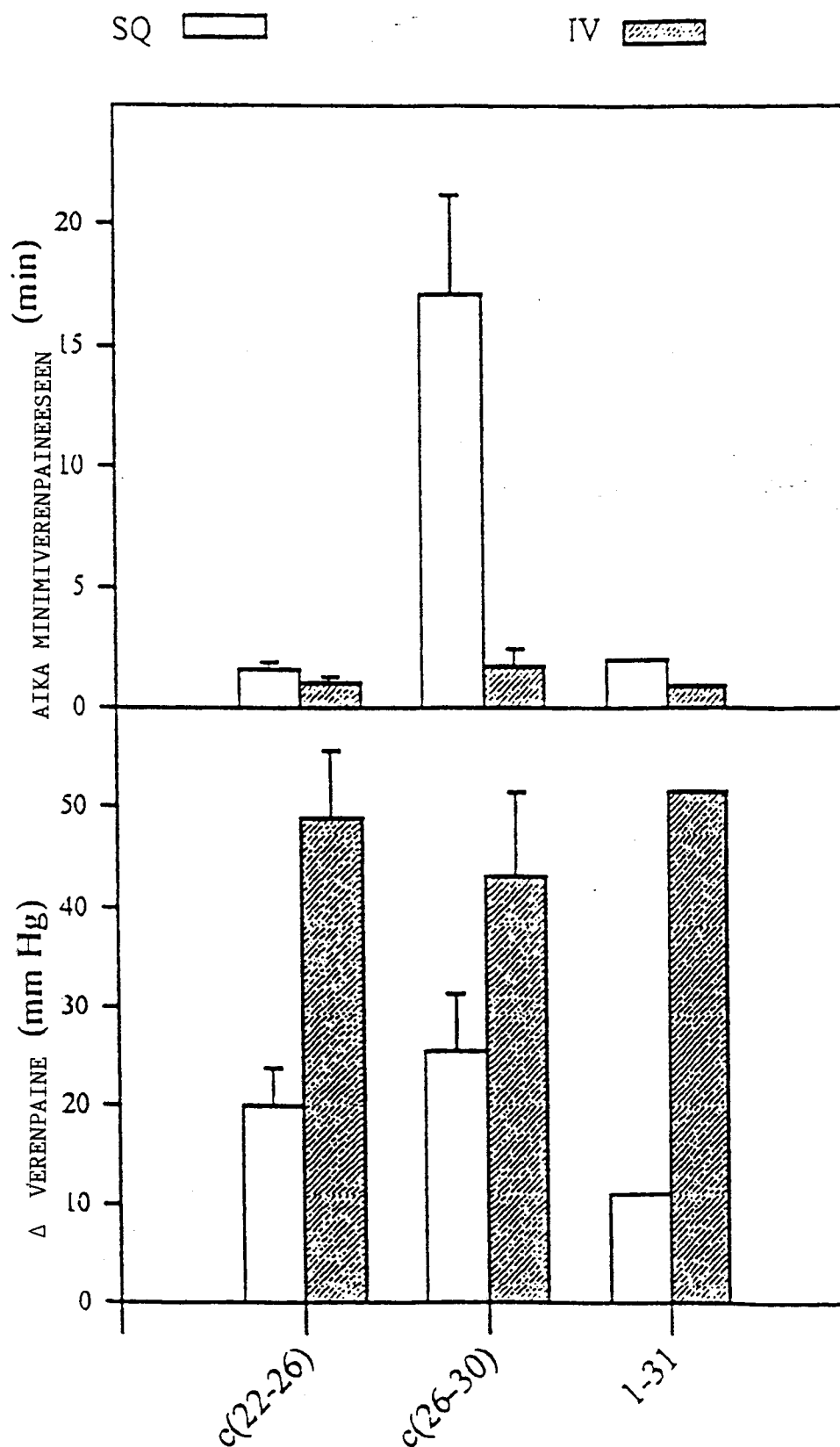


Fig. 8

7/15

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-NH₂

Fig. 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

Fig. 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

Fig. 11

8/15

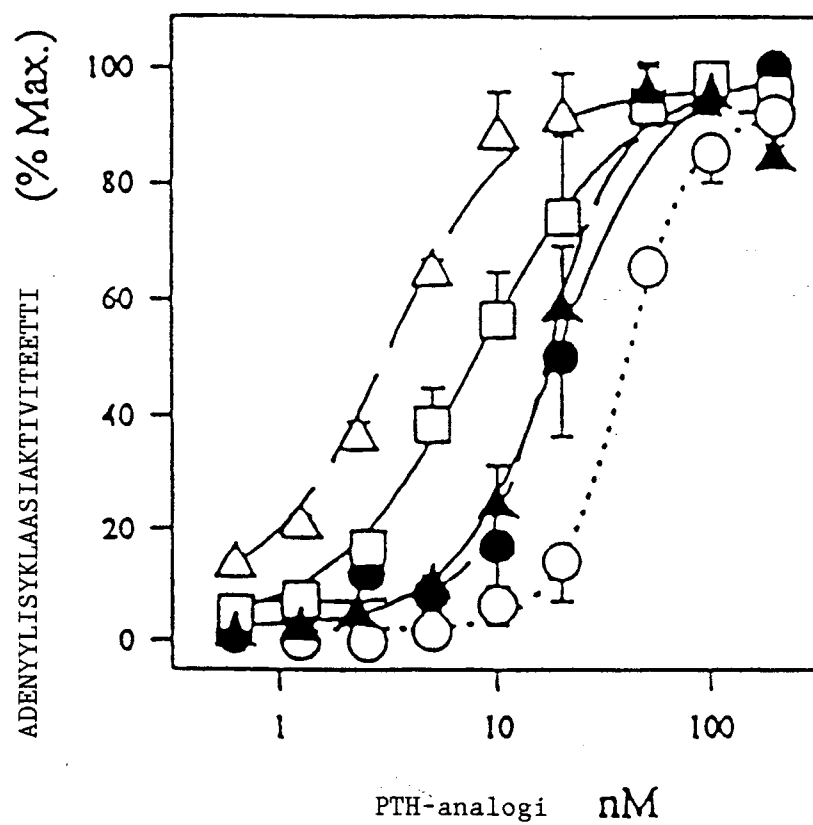


Fig. 12

9/15

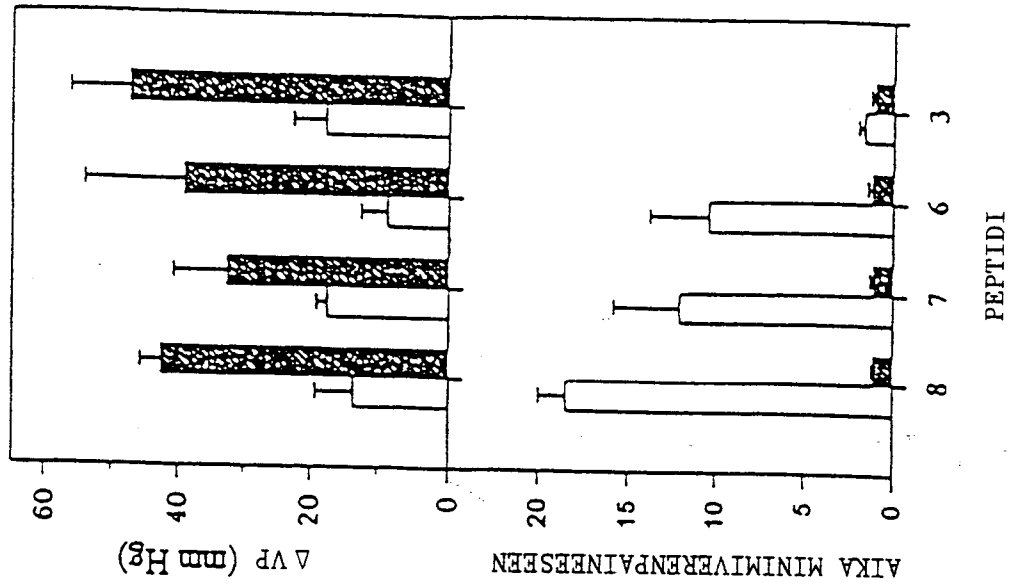
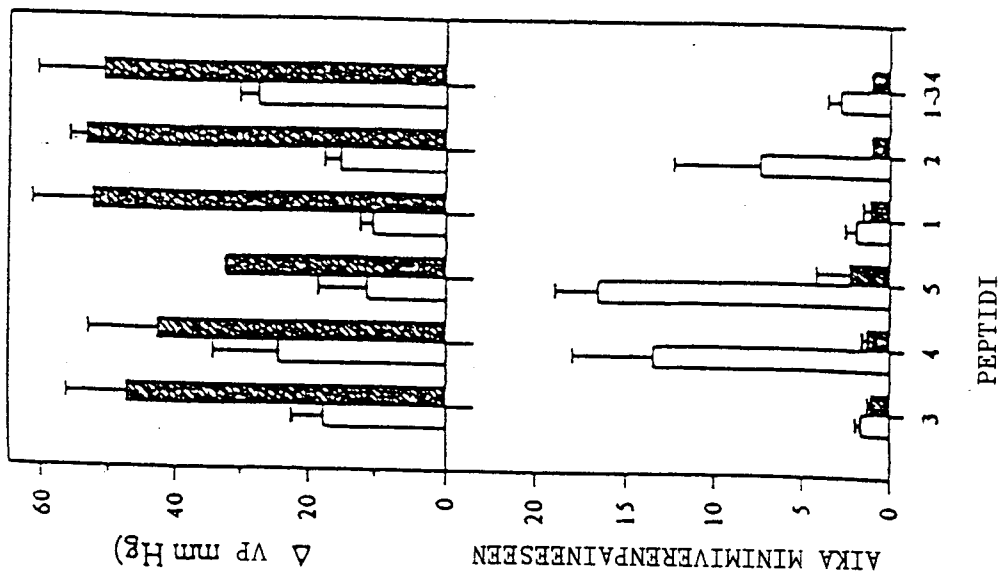


Fig. 13



10/15

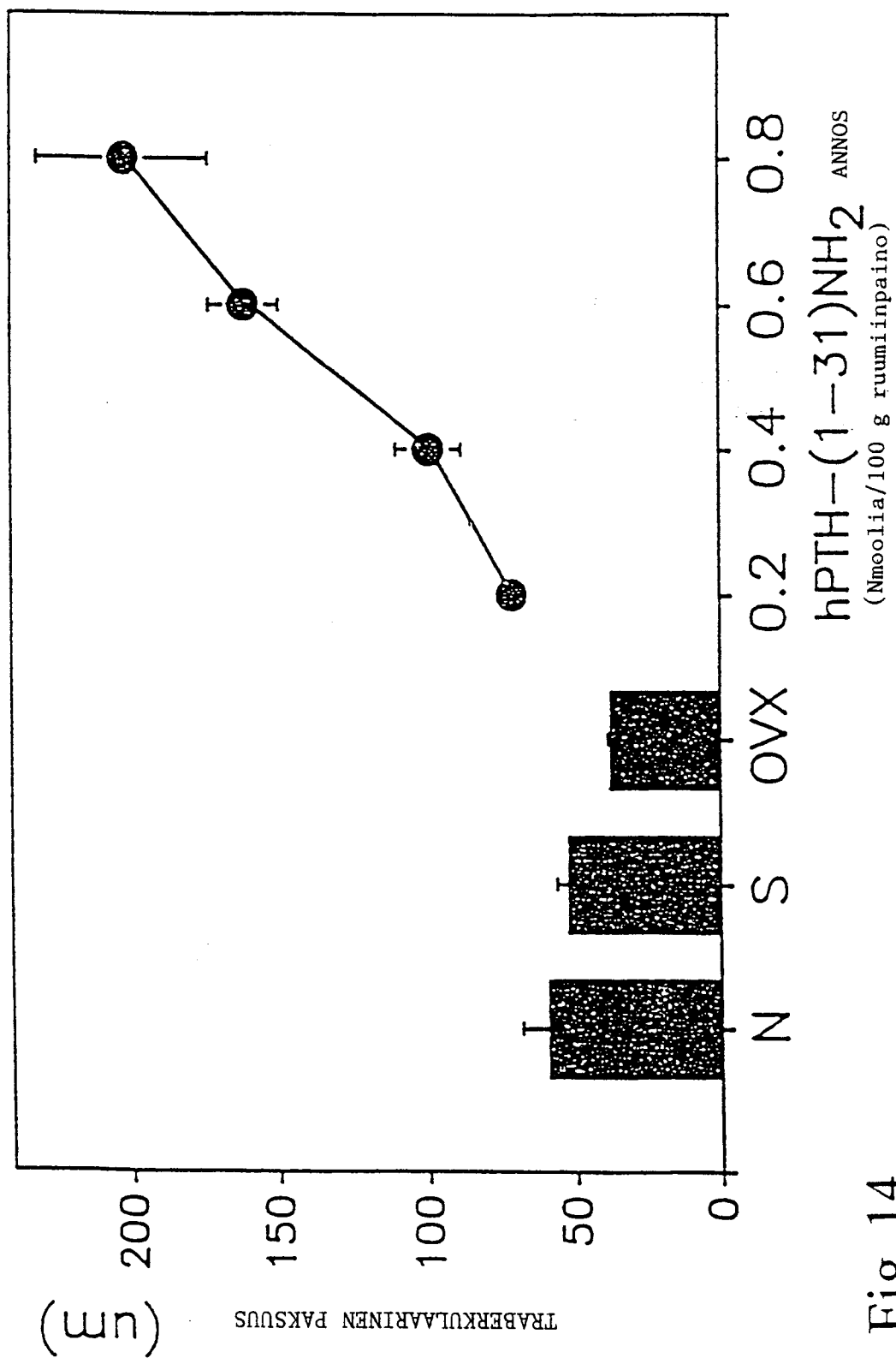
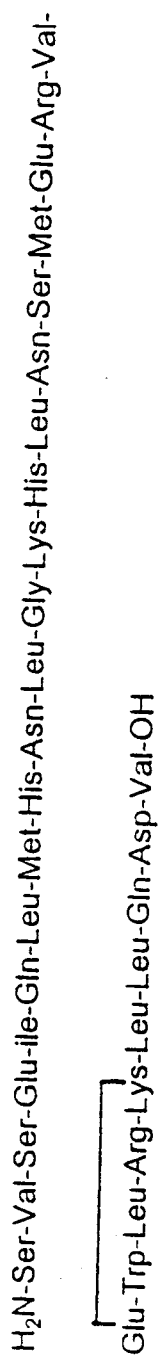
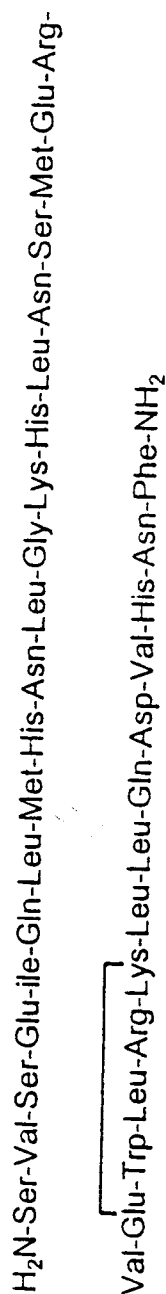
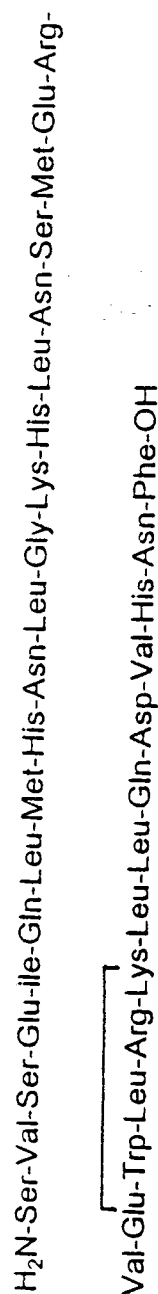


Fig. 14

11/15

**Fig. 15****Fig. 16****Fig. 17**

12/15

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-Ala-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂]

Fig. 18

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-Nle-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂]

Fig. 19

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-Leu-Leu-Gln-Asp-NH₂]

Fig. 20

13/15

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-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

Fig. 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

Fig. 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

Fig. 23

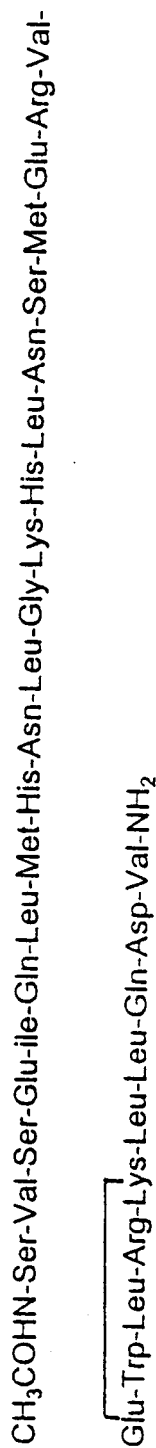


Fig. 24

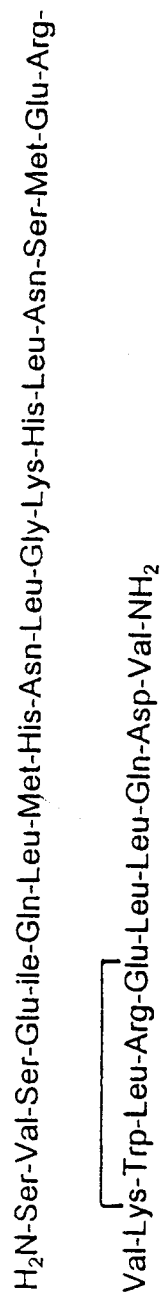


Fig. 25

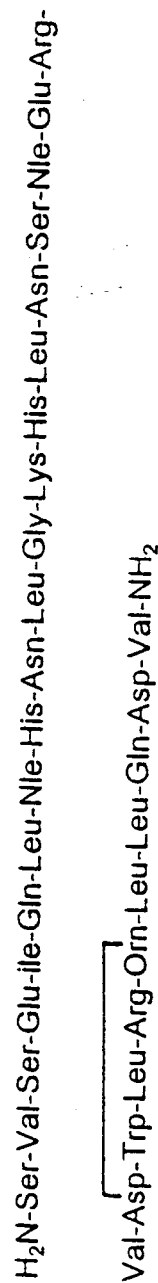


Fig. 26

15/15

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

Fig. 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-Cys-Leu-Leu-Gln-Cys-Val-NH₂

Fig. 28