

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07K 14/635

C12P 21/02

A61K 38/29

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 93116483.4

[45]授权公告日 2000 年 4 月 26 日

[11]授权公告号 CN 1051769C

[22]申请日 1993.7.14 [24]颁证日 2000.1.22

[21]申请号 93116483.4

[30]优先权

[32]1992.7.15 [33]GB [31]9215009.3

[32]1992.12.18 [33]GB [31]9226415.9

[32]1992.12.23 [33]GB [31]9226861.4

[32]1992.12.23 [33]GB [31]9226859.8

[32]1993.1.28 [33]GB [31]9301691.3

[32]1993.1.28 [33]GB [31]9301692.1

[32]1993.4.14 [33]GB [31]9307673.5

[32]1993.4.19 [33]GB [31]9308033.1

[73]专利权人 山道士有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72]发明人 W·包尔 F·卡丁劳 H·格兰姆

H·施奈德 R·布雷肯里奇

F·贡伯特 P·兰梅治 R·韦奇力

R·艾伯特 I·路易斯

[56]参考文献

EP477885 1992.4.1 C07K13/00

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 杨九昌

审查员 周 莉

权利要求书 1 页 说明书 66 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 甲状旁腺类似物,它们的生产方法和含有它们的药物组合物

[57]摘要

本发明涉及甲状旁腺素(PTH)的变异体、其生产方法、含有他们的药制剂以及药物用途。术语“PTH”指任何一种遗传编码形式的甲状旁腺激素。

更具体地说,本发明提供一种具有 PTH 样活性的并含至少一种修饰的以游离形式或盐形式或配合物形式的 PTH 化合物,所说的修饰如说明书中所述。

以游离形式的或以盐形式的 PTH 化合物具有药理学活性,例如用于预防或治疗所有与增加钙排空或吸收或者与骨中钙的固着有关的骨病有理想的效果。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种游离形式或盐形式的或配合物形式的化合物，其中该化合物选自：

[Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]-hPTH(1-34)OH
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH |
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH, 和
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH。

2. 一种生产根据权利要求 1 的化合物的方法，在该方法中将融合蛋白在细菌细胞中表达，该融合蛋白包含 N-末端噬菌体 T₄ 基因 55 多肽，该多肽具有连接到其 C-末端的所需的权利要求 1 的化合物。

3. 一种生产根据权利要求 1 的化合物的方法，该方法包括将两个肽片段通过一个酰胺键连接在一起，而所得到的肽片段是权利要求 1 的所需的化合物的所需氨基酸序列。

4. 根据权利要求 2 的方法，其中该融合蛋白包括存在于在基因 55 多肽和含有 Asp-Pro-Pro 或 Asn-Gly-Pro 氨基酸序列的所需化合物之间的、可用化学方法分裂的连接子。

5. 一种药用组合物，该组合包含以游离形式的，或以可做药用的盐的形式的或以配合物形式的根据权利要求 1 的化合物，和与之相结合的可在药物中应用的稀释剂或载体。

说明书

甲状旁腺素类似物、它们的生产 方法和含有它们的药物组合物

本发明涉及甲状旁腺素 (PTH) 的变异体、其生产方法、含有他们的药物制剂以及药物用途。

本文所使用的术语“PTH”指任何一种遗传编码形式的甲状旁腺激素，包括含有 84 个氨基酸的成熟形式脊椎动物，如，人、猪、鼠、牛、鸡的 PTH，及其片断以及其具有 PTH 样活性的类似物和衍生物。按国际上认可的方法给包含在该 PTH 序列中的每一氨基酸位置编号。为了一致并按惯例，在以下描述中，将同样的编号体系用于 PTH 序列的氨基酸。而不随分子中取代模式而变化。

更具体地说，本发明提供一种具有 PTH 样活性并含至少一种修饰的以游离形式或盐形式或配合物形式的 PTH 化合物，所说的修饰是：或者为

1. 至少一个选自 L-或 D- α -氨基酸、C₂₋₆ 烷氧基羰基和可能被取代或不取代的 C₁₋₈ 烷基、C₂₋₈ 链烯基、C₂₋₈ 炔基、芳烷基、芳烯基 (aralkenyl) 或 C₃₋₆ 环烷基-C₁₋₄ 烷基的基团并与 PTH 化合物末端氨基相连，和/或至少一个基团选自 C₂₋₆ 烷氧基羰基和可能被取代或不取代的 C₁₋₈ 烷基、C₂₋₈ 烯基、C₂₋₈ 炔基、芳烷基、芳烯基或 C₃₋₆ 环烷基-C₁₋₄ 烷基并与 PTH 化合物的一个或多个侧链氨基相连，

或者为

2. 在天然存在的 PTH 序列的 1 到 38 位中至少一个 α -氨基酸单位可以被天然的或非天然的氨基酸以保护的形式置换或不置换，

借此，在 P T H 序列氨基末端的 1 和 2 位中的氨基酸单位一起可被一种假肽所置换，

或者是这些修饰的组合

先决条件是

当该 P T H 化合物从与 N - 末端相连的 D - 或 L - α - 氨基酸或从 C₂₋₆ 烷氧基羰基或可能被取代或不取代的 C₁₋₈ 烷基、C₂₋₈ 烯基、C₂₋₈ 炔基、芳烷基、C₂₋₈ 炔基、芳烯基或 C₃₋₆ 环烷基 - C₁₋₄ 烷基游离时，它就不是一种具有天然来源的 α - 氨基酸序列的 P T H 化合物；或者该 P T H 化合物不为这样的 P T H (1 - 3 4)，其中

i. 在 1 位的 α - 氨基酸为 G l y, D-Ser, D-Ala 或 Tyr；或

ii. 在 2 位的 α - 氨基酸为 Ala, D-Val, Lys, Arg 或 Cit 且在 3 4 位的 α - 氨基酸为 T y r；或在 2 位的 α - 氨基酸为 D - V a l 且 3 4 位的 α - 氨基酸为 D - T y r；或在 2 位的 α - 氨基酸为 D - V a l，且 3 4 位的 α - 氨基酸为 D - T y l 和可选择地 8 位和 1 8 位 α - 氨基酸各自可以为 Nle；或

iii. 在 3 位和 / 或 6 位和 / 或 9 位的 α - 氨基酸被一个天然或非天然氨基酸置换；或

iv. 在 2 3 位的 α - 氨基酸被 A l a, A r g, A s n, A s p, C y s, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L y s, M e t, P r o, S e r 或 T h r 置换；或

v. 在 2 5 位和 / 或 2 6 位和 / 或 2 7 位的 α - 氨基酸被 A l a, A s n, A s p, C y s, G l n, G l u, G l y, H i s, I l e, L e u, M e t, P h e, P r o,

- S e r, T h r, T r p, T y r 或 V a l 置换; 或
- vi. 在 8 和 18 位的 α -氨基酸各自为 N l e 或各自为 M e t(O)
 且 34 位 α -氨基酸可以是 T y r; 或 8 和 18 位 α -氨基酸各自为 N l e 且 34 位的 α -氨基酸为 T y r 和或者 12 位的 α -氨基酸为 L-或 D-P r o, L-或 D-A l a, A i b 或 N m e G l y 或者 23 位的 α -氨基酸为 P h e, L e u, N l e, V a l, T y r, α -N a l 或 B-N a l;
 或
- vii. 在 28 位的 α -氨基酸为 L y s 且 30 位的 α -氨基酸为 L e u; 或
- viii. 在 1 位的 α -氨基酸为 A i b; 和/或在 8 位和/或 18 位的 α -氨基酸为 L e u, l l e, V a l, P h e 或 T r p; 和/或在 11 位的 α -氨基酸为 S e r, L l y s, P h e, β -N a l, T r p 或 T y r; 和/或在 12 位的 α -氨基酸为 D-L e u, D-l l e, D-N l e, D-V a l, D-S e r, D-S e r (丁酯), D-A b u, D-T h r, D-N v a, D-M e t, D- β -N a l, D-T r p, D-L y s, D-T y r, D-L y s (Fmoc), D-P h e 或 D-A s n; 和/或在 13 位的 α -氨基酸为 L e u; 和/或在 19 位和/或 21 位的 α -氨基酸为 A r g, L y s, A s n 或 H i s; 和/或在 23 位的 α -氨基酸为 2-(1, 3-二硫羧烷-2-基) T r p; 和/或在 25 位和/或 26 位的 α -氨基酸为 H i s; 和/或在 27 位的 α -氨基酸为 G l n 或 L e u; 或

ix. 在 8 位和 / 或 18 位的 α -氨基酸为 A l a 或 S e r ; 或在
8 位和 / 或 18 位的 α -氨基酸为 A l a , V a l , L e u ,
I l e , S e r 或 T r p 且在 34 位的 α -氨基酸为 T y r ;
或者

该 P T H 化合物不为这样的 P T H (1 - 84) : 其中

- i. 在 1 位的 α -氨基酸为 T y r , V a l , P r o , A s p 或
C y s ; 或
- ii. 2 位的 α -氨基酸为 A l a , G l u , L e u , S e r 或
A r g ; 或
- iii. 3 位的和 / 或 6 位和 / 或 9 位 α -氨基酸被一种天然或非
天然氨基酸置换, 或
- iv. 在 23 位的氨基酸由 A l a , A r g , A s n , A s p , C
L y s , . G l n , G l u , G l y , H i s , I l e , L
y s , M e t , P r o , S e r 或 T h r 置换; 或
- v. 在 25 位和 / 或 26 位和 / 或 27 位的氨基酸由 A l a ,
A s n , A s p , C y s , G l n , G l u , G l y ,
H i s , I l e , L e u , M e t , P h e , P r o ,
S e r , T h r , T r p , T y r 或 V a l 置换; 或
- vi. 在 8 位的 α -氨基酸为 M e t , M e t (O) , A l a ,
V a l , L e u , I l e , S e r , T r p , A s n , G l
n , A s p , G l u , L y s , A r g , T y r 或 G l y 且
18 位的 α -氨基酸为 L e u ; 或 8 位和 / 或 18 位 α -氨
基酸为 A l a , V a l , L e u , I l e , S e r 或 T r p ,
且 34 位 α -氨基酸可以是 T y r ;

或 8 位和 18 位的 α 氨基酸各自为 Met (O) ;

或 8 位的 α - 氨基酸为 Leu 且 18 位的 α - 氨基酸为 Met (O) ; 或

vii. 26 位的 α - 氨基酸为 Gln ;

该化合物不是 Pro° PTH (1-84) 或 [Met°, Leu⁸, Leu¹⁸] PTH (1-84) ; 或

该 PTH 化合物不是, 在 36 位的 α - 氨基酸是 Leu 的 hPTH (1-36) ,

当 PTH 序列是从一个 PTH 片断得到时, 它是一种具有 PTH 样活性的片段并含有 PTH 的 N - 末端的至少 27 个氨基酸单位 (优选高达 PTH N - 末端前 38 个氨基酸单位, 如, 1-34 到 1-38, 如 1-34, 1-36, 1-37 或 1-38 PTH) 、该 α - 氨基酸中至少一个按本发明被取代的 PTH 片断。一般存在于天然产生的 PTH 序列中的一个或几个 α - 氨基酸单位也可被删去。hPTH 片断, 尤其是 hPTH (1-34) 和 hPTH (1-36) , 是优选的。

PTH 化合物的 C - 末端可以是 -COOH, 酯化的 -COOH (如 -COOR_a 其中 R_a 为低级烷基, 例如 C₁₋₄ 烷基), -CONH₂ 或一种单或双取代的酰胺, 如 -CONR_bR_c 其中 R_b 和 R_c 之一为 H 而另一个为脂族残基, 如 C₁₋₆ 烷基或两个均为脂族残基, 或 R_b 和 R_c 与连结它们的氮原子一起形成一个杂环残基, 如吡咯烷基或哌啶子基 (piperidinyI) .

在下文中, 把这些化合物均归为本发明的化合物。

“天然氨基酸”指本领域中公知的那些。在 U.S.P.T.O 发

行的 Trademark Official Gazette (出版于 May 15, 1990, p. 33 at 46) 中已被列出并提供了标准缩写。这些氨基酸和缩写特收入本文中作参考。

以下列出了天然氨基酸：

A	A l a	丙氨酸
D	A s p	天门冬氨酸
E	G l u	谷氨酸
F	P h e	苯丙氨酸
G	G l y	甘氨酸
H	H i s	组氨酸
I	I l e	异亮氨酸
K	L y s	赖氨酸
L	L e u	亮氨酸
M	M e t	蛋氨酸
N	A s n	天门冬酰胺
Q	G l n	谷氨酰胺
R	A r g	精氨酸
S	S e r	丝氨酸
T	T h r	苏氨酸
V	V a l	缬氨酸
W	T r p	色氨酸
Y	T y r	酪氨酸

“非天然氨基酸”单位一词意指不是遗传学上编码的氨基酸单位。非天然氨基酸单位的例子包括如按以上表明的天然 α -氨基酸的 D 异

构体, Aib (氨基-异丁酸), bAib (3-氨基异丁酸), NVa (正缬氨酸), β -Ala, Aad (2-氨基-己二酸), bAad (3-氨基己二酸), Abu (2-氨基丁酸), Gaba (γ -氨基丁酸), Acp (6-氨基己酸), Dbu (2, 4-二氨基丁酸), TMSA (三甲基硅烷基-Ala), aIle (别异亮氨酸), Nle (正亮氨酸), ten、Leu, (特亮氨酸), Cit (瓜氨酸), Orn, Dpm (2, 2'-二氨基庚二酸), Dpr (2, 3-二氨基丙酸), α -或 β -Nal, Cha (环己基-Ala), 羟基-脯氨酸, Sar (肌氨酸)等, 环氨基酸单位和 N^α -烷基化的氨基酸单位, 如MeGly(N^α -甲基-甘氨酸), EtGly(N^α -乙基甘氨酸), EtAsn(N^α -乙基-天门冬酰胺)。

就保护形式的氨基酸来说, 意思是指一种天然的或非天然的氨基酸, 它具有如一种含有一个象O, S或N杂原子并能用一种O-, S-或N-保护基保护的侧链。本发明的PTH化合物的N-末端也可以是保护的形式。

作为可存在于氨基酸单位的N-末端或侧链氨基的N-保护基团包括如, 在“Protective Groups in Organic Synthesis”, T.W. Greene, J. Wiley & Sons NY(1981), 219-287 中公开的基团, 例如酰基如甲酰基、乙酰基、三氟乙酰基、甲氧琥珀酰基、羟基琥珀酰基或在苯环上可以被如对-甲氧羰基、对-甲氧基、对-硝基或对-苯基亚磺酰氨基羰基随需取代或不取代的苯甲酰基; 烷氧羰基如叔-丁氧羰基, 异丁氧羰基或甲氧羰基; 烯丙氧基羰基; 三苯甲氧基; 2, 2, 5, 7, 8-戊甲基-苯并二氢吡喃-6-磺酰基; 芳基甲氧羰基如9-氟苄基甲氧羰基或在苯环上可以被对-甲氧基, 对硝基, 邻-或对-氟, 间-苯基或3, 4-二甲基随需取代或不取代的苯甲氧

基羧基；芳基甲基如在环上可以被对一甲氧基，对一硝基或对氯随需取代或不取代的苯甲基；或芳基磺酰基如在环上可以被对一甲基或对一甲氧基随需取代的苯基磺酰基，或在环上可以被如氨基或二（ C_{1-4} 烷基）氨基随需取代或不取代的萘基磺酰基在。

含氧侧链的氧保护基为如在“*The Peptides*”，3，(1981)，E. Gross and J. Meienhofer (Ed.)中描述的。至于脂族羟基官能度，合适的氧保护基为如在上述文献“*Protection of the Hydroxy Group*”，J. M. Stewart, 169-201 中描述的，并包括苯甲基，叔一丁基和甲基。至于芳族羟基官能度，合适的氧保护基包括苯甲基，叔一丁基，甲基，甲苯磺酰基和苯甲氧基羧基。氨基酸侧链上羧基官能度的氧保护基为公知的酯基和如在“*The Peptides*”，3,101-135 (“*Carboxyl Protecting Groups*” by R.W. Roeske)描述的并包括甲基，乙基，叔一丁基和苯甲基。氨基酸侧链上硫羟官能度的硫保护基是已知的和如在“*The Peptides*”，3,137-167 (“*Sulfhydryl Group Protection*” by R.G. Hiskey)中描述的。例子包括甲基，叔一丁基，苯甲基，对一甲氧基苯基一甲基，乙基氨基一羧基和苯甲氧基羧基。

按本发明，PTH化合物的末端氨基上可以有基团至少一个基团选自L-或D- α -氨基酸， C_{2-8} 烷氧基羧基和随需取代的 C_{1-8} 烷基， C_{2-8} 烯基， C_{2-8} 炔基，芳烷基，芳烯基或 C_{3-6} 环烷基- C_{1-4} 烷基的基团，和/或一个或几个侧链氨基上有至少一个基团选自 C_{2-8} 烷氧基羧基和可以随需取代的或不取代的 C_{1-8} 烷基， C_{2-8} 烯基， C_{2-8} 炔基，芳烷基，芳烯基或 C_{3-6} 环烷基- C_{1-4} 烷基。当如此的一个基团与侧链氨基相连时，优选地在Lys单位的 Σ -氨基上。对烷基，烯基，芳烷基，芳烯基或环烷烷基烷基优选的

取代基为羟基，氨基而对于芳基部分的取代基也可卤素和/或C₁₋₄烷氧基。烷基基团或烷基部分可为线状或枝状并可以随需被O，S或N间断。优选地，在PTH化合物的氨基上，任何一个C₁₋₈烷基，C₂₋₈烯基，芳烷基，芳烯基或C₃₋₆环烷基-C₁₋₄烷基为非取代的。C₁₋₈烷基的例子是C₁₋₆烷基，优选甲基，乙基，丙基，异丙基，丁基，异丁基，叔-丁基；C₂₋₈烯基的例子为C₂₋₄烯基，优选烯丙基；C₂₋₈炔基的例子为C₂₋₄炔基，优选丙-2-炔基；芳烷基的例子为苯基或苯甲基；芳烯基的例子为苯乙烯基；C₃₋₆环烷基-C₁₋₄烷基的例子为环己基-甲基。优选地，C₂₋₆烷氧基羰基为甲酰基或乙酰基。与N-末端相连的D-或L- α -氨基酸合适的例子包括如D-或-L Pro，Ala。当存在时，优选的取代基的烷基、烯基，烷氧基羰基或与PTH化合物N-末端相连的D-或L- α -氨基酸和/或与一个或多个侧链氨基相连的至少一个烷基或烷氧基羰基。

本发明优选的PTH化合物为含有在PTH序列下列位置之一至少一个氨基酸单位被置换的那些化合物1，2，3，8-11，13到19，21，22，29到34，尤其是8-11，16-19，33和/或34。此外本发明优选的PTH化合物是含有一个以上氨基酸单位被置换的那些，尤其是两个以上的氨基酸单位，更好的是三个以上氨基酸单位，特别是5到7个取代的氨基酸单位被置换，优选地为上述所提及PTH序列位置的任意组合。

在一系列特定的或可选择的具体方案中，本发明提供了一种如上所描述的PTH化合物，其中尤其是在PTH序列的氨基末端的，和2位中的 α -氨基酸被假二肽所置换。

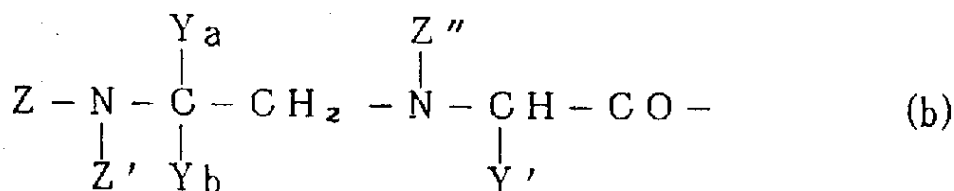
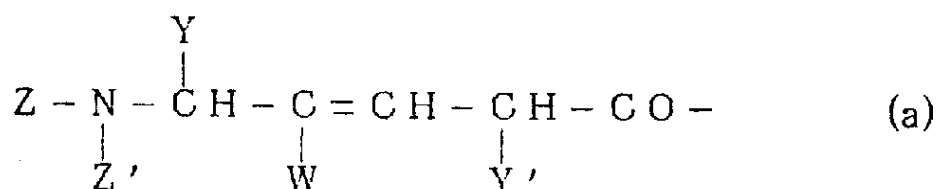
文中所使用的“假=肽”一词指一种二肽等排物，其中在该2个氨基酸残基间的肽键（是天然的或是非天然的）被一个等排基团如， $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ， $-\text{C}(\text{卤素})=\text{CH}-$ 或 $-\text{C}(\text{烷基})=\text{CH}-$ 置换。

其中1位和2位的 α -氨基酸被假二肽置换的本发明化合物的例子包括如式I的游离形式或盐形式或配合物形式的化合物，



其中

X为一种式(a)或(b)残基



其中Z和Z'各自独立地为H；可随需取代或不取代的 C_{1-8} 烷基， C_{2-8} 烯基，芳烷基，芳烯基或 C_{3-6} 环烷基- C_{1-4} 烷基；或一种保护基，至多Z和Z'之一为一种保护基，Z''为H， C_{1-8} 烷基或一种保护基，

Y和Y'各自独立地为一种天然或非天然 α -氨基酸可随需被保护的侧链，

Y_a 和 Y_b 之一为氢而另一个为一种天然或非天然 α -氨基酸的可随需被保护的侧链或 Y_a 和 Y_b 和与他们相连的碳原子一起形成一个 C_{3-6} 环烷基基团，

和

W为卤素或C₁₋₄烷基，

或W和Y'与他们相连的 $\begin{array}{c} -C=CH-CH- \\ | \qquad \qquad | \end{array}$ 部分一起，形成一

个可以随需被取代或不取代的芳族环或杂环残基，和

P₁为一个如上定义的PTH序列，其中N-末端1位和2位氨基酸单位被删去。

式I化合物中，P₁可为PTH一个的片断(3-Z)，其中Z为84或从27到38的整数，优选从34到38，尤其34，36，37或38，特别是34或36。P₁代表的PTH序列或者可与天然产生的PTH序列相对应，或者可与天然产生的PTH序列中至少一个α-氨基酸单位已被天然的或非天然的氨基酸以保护的形式置换和/或一个或多个α-氨基酸单位也被删去的PTH序列相对应。P₁也可以包含至少一个侧链氨基按以上描述来取代的。

卤素优选的为氟或氯。

在式(a)残基中，双键最好具有反式构型(E)。

作为与天然α-氨基酸的α-碳原子相连的残基，Y，Y'，Y_a或Y_b可以是存在了以上所列的天然α-氨基酸中的侧链，如存在于Gly(即H)，Ala，Val，Ser，Leu，Ile，Phe，Trp中的。Y，Y'，Y_a或Y_b也可以是与按以上指出的非天然α-氨基酸的α-碳原子相连的残基，如，在Nva，Orn，Abu，Aib，Nle中的。如果作为Y，Y'，Y_a或Y_b的天然或非天然氨基酸侧链包括杂原子如O，S或N，侧链上的杂原子可以随需用O-，S-或N-保护基来保护，如，以上所指出的。

保护基团如Z或Z'或Z''可为以上所描述的。C₁₋₈烷基如Z

或 Z' 或 Z'' 可以是如上述表示的。

优选地，Z 或 Z' 为氢或 C₁₋₄ 烷基，尤其是氢或甲基。

优选地 Y 为 H 或 CH₃。

当 W 是 C₁₋₄ 烷基时，它最好是 CH₃。

当 W 和 Y' 与其相连的部分一起形成可以随需取代或不取代的芳族环或杂环残基时，它为一种可以含有或不含有选自 N，S 和 O 的 1 或 2 个杂原子的芳族 5-或 6 元环残基，如，苯基，咪唑基，吡啶基，噁唑基或噻唑基。优选的取代基为羟基或甲氧基，尤其对于苯基环。

Y' 优选地为 H，CH₃，异丙基或苯甲基。

当 Z'' 为 C₁₋₈ 烷基时，优选 CH₃，C₂H₅ 或异丙基。

如果 Y_a 和 Y_b 一起是 C₃₋₆ 环烷基优选为环丙基或环戊基。

当 Z'' 为保护基团时，优选酰基，尤其乙酰基。

在一系列特定的和可选择的实施例中，本发明提供一种如上所描述的 PTH 化合物，其中 PTH 序列 N-末端的 1 位 α-氨基酸单位和 / 或 2 位 α-氨基酸单位被一种保护或未保护的天然或非天然氨基酸残基所置换，先决条件是：

当 PTH 化合物是从与 N-末端相连的 D-或 L-α-氨基酸游离或从 C₂₋₆ 烷氧基羰基或取代或未取代的 C₁₋₈ 烷基，C₂₋₈ 烯基，C₂₋₈ 炔基，芳烷基，芳烯基或 C₃₋₆ 环烷基-C₁₋₄ 烷基游离时，它不是一种具有天然产生的 α-氨基酸序列的 PTH 化合物；

或该 PTH 化合物不为这样的 PTH (1-34)；其中

i. 在 1 位的 α-氨基酸为 Aib, Gly, D-Ser, D-Ala 或 Tyr, 或

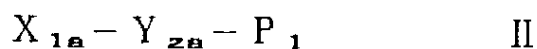
ii. 在 2 位的 α-氨基酸为 Ala, D-Val, Lys,

C i t 或 A r g 且在 3 4 位的 α -氨基酸为 T y r ; 或在 2 位的 α -氨基酸为 D - V a l 且在 3 4 位的 α -氨基酸为 D - T y r 和可有可无地 8 位和 1 8 位 α -氨基酸各自为 N l e ; 或

- iii. 在 1 位的 α -氨基酸为 A i b 且至少另一个 α -氨基酸单位已被如下置换: 8 位和 / 或 1 8 位 α -氨基酸为 L e u , I l e , V a l , P h e 或 T r p , 和 / 或 1 1 位 α -氨基酸为 S e r , L y s , P h e , β -N a l , T r p 或 T y r , 和 / 或 1 2 位 α -氨基酸为 D - L e u , D - I l e , D - N l e , D - V a l , D - S e r , D - S e r (丁酯) , D - A b u , D - T h r , D - N v a , D - M e t , D - β -N a l , D - T r p , D - L y s , D - T y r , D - L y s (F m o c) , D - P h e 或 D - A s n , 和 / 或 1 3 位 α -氨基酸为 L e u , 和 / 或 1 9 位和 / 或 2 1 位 α -氨基酸为 A r g , L y s , A s n 或 H i s , 和 / 或 2 3 位 α -氨基酸为 2 - (1 , 3 - 二硫羧烷 - 2 - 基) T r p , 和 / 或 2 5 位和 / 或 2 6 位 α -氨基酸为 H i s , 和 / 或 2 7 位 α -氨基酸为 G l n 或 L e u , 或该 P T H 化合物不是这样的 P T H (1 - 8 4) : 其中
- i. 1 位 α -氨基酸为 T y r , V a l , P r o , A s p 或 C y s ; 或
- ii. 2 位的 α -氨基酸为 A l a , G l u , L e u , S e r 或 A r g .

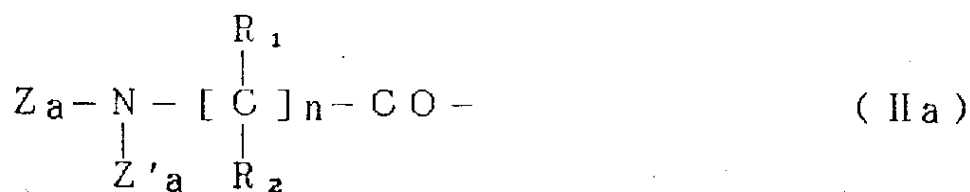
在 1 位和 / 或 2 位的 α -氨基酸被按以上所指示的 置换

的本发明化合物的例子包括如式 II 化合物



其中

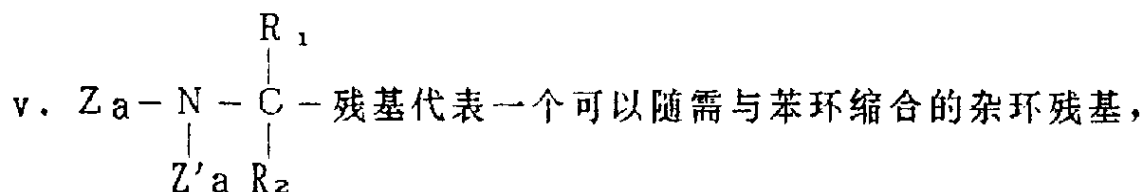
X_{1a} 为一种被保护或未保护的天然 α -氨基酸残基或一种式 (II_a) 残基



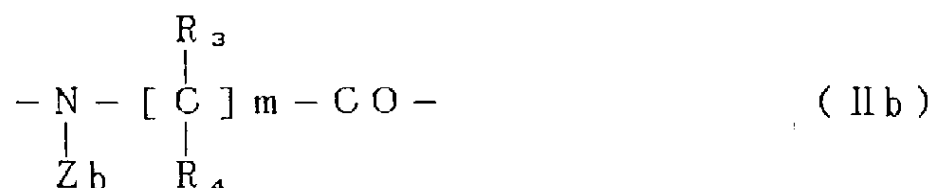
其中

Z_a 和 Z'_a 各自独立地为 H, C_{1-6} 烷基或一种保护基, Z_a 和 Z'_a 至多之一为保护基, 和或者 n 为 1 且

- i. R_1 和 R_2 各自独立地为 C_{1-6} 烷基, 或
- ii. R_1 和 R_2 之一为甲基或乙基而另一个为一种保护或未保护的与天然 α -氨基酸 (Ala, Leu, Ile 或 Val 除外) 的 α -碳原子相连的残基, 或
- iii. R_1 和 R_2 之一为氢、甲基或乙基而另一个为一种保护的或未保护的与非天然 α -氨基酸的 α -碳原子相连的残基, 或
- iv. R_1 和 R_2 和与他们相连的碳原子一起形成 C_{3-6} 环烷基基团, 或



或 n 为 2, 3, 4 或 5 且 R_1 和 R_2 各自为 H 或 CH_3 , Y_{2a} 为一种保护的或未保护的天然 α -氨基酸残基或一种式 (IIb) 残基



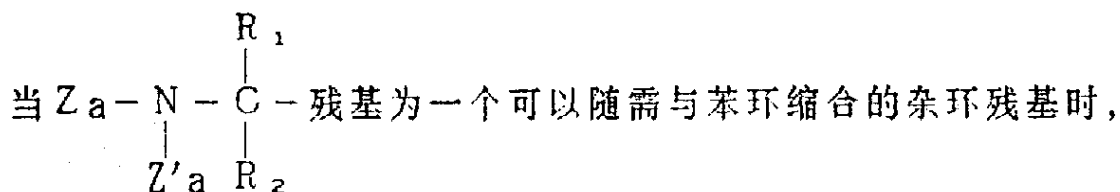
Z_b 为 H 或 C_{1-6} 烷基且或者 m 为 1 而

i. R_3 和 R_4 各自独立地为 C_{1-6} 烷基，或

ii. R_3 和 R_4 之一为甲基或乙基而另一个为一个保护的或未保护的与天然 α -氨基酸 (Ala, Leu, Ile 或 Val 除外) 的 α 碳原子相连的残基，或

iii. R_3 和 R_4 之一为 H，甲基或乙基而另一个为一个保护的或未保护的与非天然 α -氨基酸的 α 碳原子相连的残基，

或者 m 为 2, 3, 4, 或 5 而 R_3 和 R_4 各自为 H 或 CH_3 ，和 P_1 定义同上。



它可为一个由饱和或不饱和的含有一个或多个选自 N, O 和 S 杂原子的 5-或 6-元素环衍生的残基。此类杂环残基的例子包括如，2-吡啶基，3-吗啉基，六氢化哒嗪基，2-或 3-吡啶基。

当 n 或 m 大于 1 时， CR_1R_2 或 CR_3R_4 部分可为 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ ，丙基，丁基或戊基。

C_{3-6} 环烷基如 R_1 和 R_2 优选地为环丙基或环戊基。

作为与天然 α -氨基酸的 α -碳原子相连的残基， R_1 ， R_2 ， R_3 或 R_4 可以是存在于以上所列天然 α -氨基酸中的侧链，如，存在于 Gly, Ser 或 Thr 中的。 R_1 和 R_2 之一或 R_3 和 R_4 之

一可为甲基或乙基而另一个可为 CH_3 ，异丙基，异丁基或 $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{CH}_3) -$ 。 R_1 ， R_2 ， R_3 或 R_4 也可与以上表示的非天然 α -氨基酸的 α -碳原子相连的残基，如，存在于 A b u ， G a b a ， N v a ， A i b ， T M S A 或 N l e 中的。如果天然或非天然氨基酸的侧链如 R_1 ， R_2 ， R_3 或 R_4 包括杂原子如 O ， S 或 N 时，在侧链上的该杂原子可以随需用 $\text{O}-$ ， $\text{S}-$ 或 $\text{N}-$ 保护基团来保护或不保护，如按以上所表示的。保护基团如 Z a 或 $\text{Z a}'$ 可为以上所描述的。 C_{1-6} 烷基如 Z b 优选地为甲基或乙基。 Z b 最好是 H 。 C_{1-6} 烷基如 Z a 或 $\text{Z a}'$ 优选地为直链或支链 C_{1-4} 烷基。优选地， Z a 和 $\text{Z a}'$ 之一为 H 而另一个为 H ， C_{1-4} 烷基或一个保护基团，尤其是 H 。

在另一个实施例中，本发明也提供一种以上所描述的 P T H 化合物，其中在 8 位上的 α -氨基酸单位和 / 或 18 位的 α -氨基酸单位被一个保护的或未保护的天然或非天然氨基酸残基所置换，先决条件是：

当该 P T H 化合物是从与 N -末端相连的 D -或 L - α -氨基酸游离或从 C_{2-6} 烷氧基羰基或随需取代的或未取代的 C_{1-6} 烷基， C_{2-6} 烯基， C_{2-6} 炔基，芳烷基，芳烯基或 C_{3-6} 环烷基 - C_{1-4} 烷基游离时，它不是具有天然产生的 α -氨基酸序列的 P H T 化合物；或该 P T H 化合物不是这样的 $\text{P T H}(1-34)$ ：其中

- i. 在 8 位和 18 位的 α -氨基酸各为 N l e 或各为 $\text{M e t}(\text{o})$ 而 34 位 α -氨基酸可随需选择 T y r ；或在 8 位和 18 位的 α -氨基酸各为 N l e 而在 34 位和 α -氨基酸为 T y r 且或者在 12 位的 α -氨基酸为 L -或 $\text{D}-\text{P r o}$ ， $\text{L}-$

a k D - A l a , A i b 或 N M e G l y 或者在 2 3 位的 α - 氨基酸为 P h e , L e u , N l e , V a l , T y r , α - N a l 或 β - N a l ; 或在 8 位和 1 8 位的 α - 氨基酸各为 N l e 而在 2 位的 α - 氨基酸为 D - V a l 且在 3 4 位的 α - 氨基酸为 D - T y r ; 或

ii. 在 8 位和 / 或 1 8 位的 α - 氨基酸为 L e u , I l e , V a l , P h e 或 T r p 且选择地至少一个另外的 α - 氨基酸单位已被按如下置换: 在 1 位的 α - 氨基酸为 A i b 和 / 或在 1 1 的位 α - 氨基酸为 S e r , L y s , P h e , β - N a l , T r p 或 T y r , 和 / 或在 1 2 位的 α - 氨基酸为 D - l e u , D - I l e , D - N l e , D - V a l , D - S e r , D - S e r (丁酯) , D - A b u , D - T h r , D - N v a , D - M e t , D - β - N a l , D - T r p , D - L y s , D - T y r , D - L y s (F m o c) , D - P h e 或 D - A s n , 和 / 或在 1 3 位的 α - 氨基酸为 L e u , 和 / 或在 1 9 位的和 / 或在 2 1 位的 α - 氨基酸为 A r g , L y s , A s n 或 H i s , 和 / 或 2 3 位 α - 氨基酸为 2 - (1 , 3 - 二硫茂烷 - 2 - 基) T r p , 和 / 或在 2 5 位和 / 或 2 6 位的 α - 氨基酸为 H i s , 和 / 或在 2 7 位的 α - 氨基酸为 G l u 或 L e u ; 或

iii. 在 8 位和 / 或 1 8 位的 α - 氨基酸为 A l a 或 S e r ; 或在 8 位和 / 或 1 8 位的 α - 氨基酸为 L e u , 且在 3 4 位的 α - 氨基酸为 T y r ; 或

该 P T H 化合物不是这样的 P T H (1 - 8 4) : 其中

在 8 位的 α -氨基酸为 Met, Met(o), Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Trp, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, Tyr 或 Gly 而在 18 位的 α -氨基酸为 Leu; 或在 8 位和 18 位的 α -氨基酸各为 Met(o); 或在 8 位的 α -氨基酸为 Leu 而在 18 位的 α -氨基酸为 Met(o); 或

该 PTH 化合物不是 [Leu¹⁸, Tyr³⁴]hPTH(1-84), [Leu⁸, Tyr³⁴]hPTH(1-84), [Ile⁸, Leu¹⁸, Tyr³⁴]hPTH(1-84) 或 [Leu⁸, Leu¹⁸, Tyr³⁴]hPTH(1-84)。

当在 8 位的 α -氨基酸单位被一个非天然氨基酸置换时, 它可为以上描述的非天然氨基酸, 如 Nva, Nle 或 Cha、优选地为一个非天然亲水氨基酸, 此氨基酸含有直链烷基残基是优选的, 尤其优选的是 Nva (正缬氨酸) 和它的类似物。PTH 序列第 8 位非天然氨基酸也可为一个 C₂-甲基化的或 C₂-乙基化的天然 α -氨基酸。

其中第 18 位 α -氨基酸单位被置换的本发明 PTH 化合物的例子, 如其中第 18 位 α -氨基酸残基被天然氨基酸残基如 Gln, Tyr 或 Lys 置换的 PTH 化合物, 例如 [Gln¹⁸]-PTH, [Lys¹⁸]-PTH 和 [Tyr¹⁸]-PTH, 尤其是 [Gln¹⁸ 或 Lys¹⁸ 或 Tyr¹⁸]-hPTH-(1-x), 其中 x 为 84 或 27 到 38 的整数, 尤其是 34 到 38 的整数。当 PTH 序列为一个 (1-36) PTH 片断时, 第 18 位是 Ala 也是特别优选的。在这些化合物中, 在 8 位的氨基酸可为 Met 或可由选自 Leu, Ile, Val, Phe, Gln, Trp, Ser 和 Ala 的氨基酸置换或

可以是一个非天然亲水氨基酸残基，如，Nva或Nle。

本发明这样的PTH化合物的另一组包括如，其中在8位的氨基酸残基由一个非天然亲水氨基酸残基（如Nle或更优选Nva）取代的PTH化合物。在这些化合物中，第18位氨基酸可为Met或可由选自Leu, Ile, Val, Phe, Trp, Ser, Ala, Gln, Lys或Tyr的氨基酸置换，优选Leu, Gln, Ala或Tyr。

本发明此类PTH化合物的另一组为在保留位置如1到7, 9到17和/或19到38中的一个或多个氨基酸单位或者被删去或者除了在8和/或18位中的 α -氨基酸取代之外再被置换的那些化合物。在该情况下，8位 α -氨基酸优选地被Leu置换而18位 α -氨基酸被Gln, Leu, Ala或Tyr置换。

在另外的或可选择的具体实例中，本发明还提供了一种如上描述的PTH化合物，其中至少一个PTH序列的 α -氨基酸序列被存在于PTHrp中相应位置上的 α -氨基酸单位置换，先决条件是：

当该PTH化合物从与N-末端相连的D-或L- α -氨基酸或从C₂₋₆烷氧基羰基或取代或未取代的C₁₋₈烷基，C₂₋₈烯基，C₂₋₈炔基，芳烷基，芳烯基或C₃₋₈环烷基-C₁₋₄烷基游离时，它不为一种具有天然产生的 α -氨基酸序列的PTH化合物；

或该PTH化合物不为PTH(1-34)，其中

- i. 在8位和/或18位的 α -氨基酸为Leu；和/或在H位的 α -氨基酸为Lys；和/或在19位和/或21位的 α -氨基酸为Arg；和/或在25位和/或26位的 α -氨基酸为His；和/或在27位的 α -氨基酸为Leu；或

ii. 在 25 位的 α -氨基酸为 Gln 和 / 或在 26 位的 α -氨基酸为 Asn, 在 27 位的 α -氨基酸可以是 Leu; 或该 PTH 化合物不为 [Leu⁸, Leu¹⁸] PTH (1-84)。

“PTHrp”一词指任何一种遗传编码形式的 PTHrp, 如, 人、鸡、小鼠或鼠的 PTHrp。为了一致并按惯例, 在以下描述中, 将同样的编码体系用于在 1 位以 Ala 起始并含有如, 38 位 Ala 的 PTHrp 序列的氨基酸。

本发明的该组化合物为 PTH 和类似的 PTHrp 序列之间的杂化物 (文中指 PTH-rp 杂化物)。按本发明取代的氨基酸序列是发生在从 1 位直到 38 位, 尤其 1 到 36 位, 特别是 1 到 34 位。

本发明优选的 PTH 化合物是 PTH-rp 杂化物, 其中该 PTH 序列的一个以上 α -氨基酸单位 (如, 至少 2 个, 优选为 3 到 5 个 α -氨基酸单位) 按本发明被取代。

本发明优选的一组 PTH-rp 杂化物包括在 PTH α -氨基酸序列中 8 到 11 位的至少一个 α -氨基酸单位 (即, Met⁸, His⁹, Asn¹⁰ 或 Leu¹¹) 被相应的 PTHrp 序列相应的 α -氨基酸单位 (即, Leu⁸, His⁹, Asp¹⁰ 或 Lys¹¹) 取代的 PTH 化合物。在 8 位和 / 或 10 位的取代是优选的, 尤其是第 8 位和 10 位。更优选地, 所说 PTH 序列的 8, 10 和 11 位 α -氨基酸分别被 Leu⁸, Asp¹⁰ 和 Lys¹¹ 取代。

本发明优选的另一组 PTH-rp 杂化物包括 PTH α -氨基酸序列 16 位到 19 位中至少一个 α -氨基酸单位被相应的 PTHrp 序列相应的 α -氨基酸单位 (即, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹) 取代的 PTH 化合物。优选地, 所说序列的 3 个或所有 4

个 α -氨基酸被取代。尤其优选的是在16位的 α -氨基酸为Gln, 在18位的 α -氨基酸为Leu且在19位 α -氨基酸为Arg的本发明PTH化合物。

本发明另一个优选的一组PTH-rp杂化物包括PTH α -氨基酸序列33和34位的至少一个 α -氨基酸单位由相应的PTHrp序列的相应的 α -氨基酸单位(即, Thr³³, Ala³⁴)取代的PTH化合物。优选地, 两个 α -氨基酸均被取代。

本发明再进一步优选的PTH-rp杂化物组为包含上述 α -氨基酸取代物(8-11, 16-19, 33-34)的任何组合的PTH化合物, 更优选地, 选自以上指出的8-11和33-34序列取代物的组合物。

正如可预知的那样, 在本发明的PTH-rp杂化物中, 在1到38位的一个或多个 α -氨基酸可进一步被以上所指出的天然或非天然氨基酸取代或被删去。在10位中可以有一个 α -氨基酸选自Gly, Gln, Glu, His, Ser, Thr或Tyr。在13位中可有一个除Arg外的D-或L- α -氨基酸, 如, Ala, Cys, Gln, Ile, Asn, Trp, Asp, Val, Ser, Thr, Tyr, Met, Leu或Gly; 在16位中可有一个D-或L- α -氨基酸, 如, Lys, Ser, Leu, Ala, Gln或Gly; 在17位中的Ala或Ser或优选地为一个具有比Ala或Ser大的侧链的氨基酸, 如, Glu, Gln, Phe, His, Ile或Lys; 在18位中是Gln或Tyr; 19位为Ala, Arg, Val, Tyr, Ser, Lys, Met, His, Gly, Pro, Asn或Ile; Gln或Arg在26位中, 和/或33

位为一个D-或L- α -氨基酸如, S e r, T h r, L e u, G l y, G l n, A r g, P r o, A s p, I l e, L y s, 或T h r。他们也可按以上指出的在N-末端或在侧链氨基上被取代。如果需要, 本发明的P T H-r p杂化物的含S-或O-侧链也可按以上所描述的方法来保护。

本发明优选的P T H-r p杂化物的例子为 [L e u⁸, G l n¹⁸, T h r³³, A l a³⁴] P T H, [L e u⁸, A l a¹⁶, G l n¹⁸, T h r³³, A l a³⁴] P T H, [L e u⁸, A s p¹⁰, L y s¹¹, A l a¹⁶, G l n¹⁸, T h r³³, A l a³⁴] P T H, [L e u⁸, A s p¹⁰, L y s¹¹, A l a¹⁶, G l n¹⁸] P T H, [L e u⁸, A l a¹⁶, G l n¹⁸, A l a¹⁹] P T H, [L e u⁸, A s p¹⁰, L y s¹¹, G l n¹⁸] P T H, [L e u⁸, A s p¹⁰, L y s¹¹, A l a¹⁶, G l n¹⁸, A l a¹⁹] P T H, [L e u⁸, A l a¹⁶, G l n¹⁸, A l a¹⁹, T h r³³, A l a³⁴] P T H和 [L e u⁸, A s p¹⁰, L y s¹¹, G l n¹⁸, T h r³³, A l a³⁴] P T H。

本发明优选的P T H-r p杂化物为P T H(1-x')化合物, 其中x'为一个从34到38的整数, 尤其是34, 36, 37或38, 特别是h P T H(1-x'), 其中一个或多个 α -氨基酸被存在在P T H r p相应位置上的 α -氨基酸置换, 优选地按以上所描述的。当33位和34位被相应的P T H r p的 α -氨基酸序列置换时, 该P T H化合物优选地为一个含有34个 α -氨基酸单位的h P T H片断。具有羧基末端的P T H-r p杂化物是较好的。

优选地, P T H r p为h P T H r p。

本发明的化合物可以如游离形式, 盐的形式或以其复合物的形式

存在。酸加成的盐可用如有机酸，聚合物的酸和无机酸来形成。此类酸加成盐的形式包括如盐酸盐和乙酸盐。复合物如由本发明的化合物加成无机物（如，无机盐或氢氧化物象 Ca - 和 Zn - 盐）和 / 或加成聚合的无机物来形成。

本发明还提供一种生产本发明化合物的方法。他们可以分步的方式或者在溶液中或者使用固相合成法或基因工程法来制备。

例如，本发明的化合物可如下来制备：

- a) 除去以保护方式存在于本发明化合物中的至少一个保护基团；
或
- b) 通过酰胺键，将两个肽片断连结在一起，获得所需化合物的所需氨基酸的肽片断，然后可选择地实施阶段 a) 的过程。
- c) 为了产生一种在氨基末端的 1 和 2 位的 α - 氨基酸被一种假二肽置换的 P T H 化合物，将一种保护的或未保护形式的假二肽与一种 1 和 2 位氨基酸残基被删去的保护或未保护形式的 P T H 肽进行反应并且如需要再进行步骤 a) 的过程；或
- d) 为了产生一种含有至少一个选自如下基团的 P T H 化合物：
与 N - 末端相连的 D - 或 L - α - 氨基酸和与末端氨基相连的和 / 或与侧链氨基相连的 C_{2-6} 烷氧基羰基和取代或未取代的 C_{1-8} 烷基， C_{2-8} 烯基， C_{2-8} 炔基，芳烷基，芳烯基或 C_{3-6} 环烷基 - C_{1-4} 烷基，将如此的一个基团引入到以保护或非保护的形式的 P T H 化合物中并从此基团游离，
且如果需要进行步骤 a) 的过程；

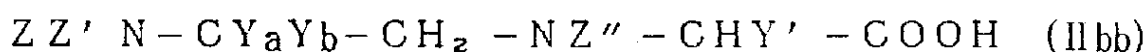
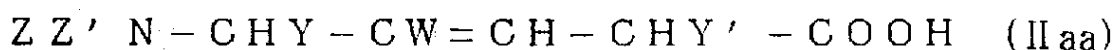
并且回收所获得的游离形式，盐的形式或复合物形式的该化合物。

步骤 a)， b) 和 c) 的过程可以与已知方法类似的方式，如按

本领域已知的肽化学或按下列实施例所描述的方式来实施。需要时，在这些反应中，适用于肽类的保护基团可用功能基不参于反应。保护基团一词也可包括一种具有功能基团的聚合物树脂。

在步骤 b) 过程中，为产生氨基末端 1 和 2 位 α -氨基酸单位被假二肽置换的 P T H 化合物，一个用作起始材料的肽片断有含有 N-末端的假二肽。该起始材料可按步骤 c) 的过程来制备。

在步骤 c) 的过程中，用作起始材料的假二肽可为一种或 II aa 或 II bb 的化合物



其中 Y, Y', Y_a, Y_b, Z, Z', Z'' 和 W 如上定义，或某一种功能衍生物，如酯，酰基卤或一种对称的或不对称的酐。W 和 Y' 和与他们相连的 $\text{C} = \text{CH} - \text{CH} -$ 部分一起形成一种取代或未取代的

芳族环或杂环残基的式 II aa 化合物和 Z'' 为烷基或保护基团（如，乙酰基）或其中 $\text{C} \text{Y}_a \text{Y}_b$ 为 C₃₋₆ 环烷基且 Z'' 为 H 的式 II bb 化合物为新的并构成本发明的一部分。

步骤 d) 的过程可按类似于已知的方法来进行，如，烷基化方法。在本发明优选的实施例中，烷基化反应是在还原条件下进行的，如使用相应的醛或酮。它可在如 NaBH₃CN 存在下进行，优选地在酸性 PH，如从 5 到 7。反应温度可为如从 -20 °C 到 100 °C。在惰性溶剂中进行反应是有利的，如，水，一种醇，二噁烷或 DMF 或它们的一种混合物。D-或 L- α -氨基酸也可按已知的方法与 N-末端相连。

在步骤 b) 过程中用作起始材料的肽片断可包括一种或多种非天

然氨基酸单位；也可在N-末端和/或侧链氨基上被选自C₂₋₆ 烷氧基羰基，取代或未取代的C₁₋₈ 烷基，C₂₋₈ 烯基，C₂₋₈ 炔基，芳烷基，芳烯基或C₃₋₈ 环烷基-C₁₋₄ 烷基的基团所取代或它也可载于一个N-末端的D-或L-α-氨基酸上。

含有天然α-氨基酸单位的本发明化合物或其片断也可采用重组技术来制备。

按本发明的一个优选的实施例，还提供一种生产中等大小的多肽的方法，其中一种融合蛋白被细菌细胞表达，该蛋白含N-末端噬菌体T₄ 基因的5'5'多肽，并且所需要的多肽链接在它的C-末端。

基因5'5'多肽可包含噬菌体T₄ 的完整的g p⁵⁵蛋白(188氨基酸残基)，该蛋白已被描述在 Gram, H. 和 Rüger, R; 1985; The EMBO Journal, 4, (1), pp 257-264 中。另外一个片断，一个g p⁵⁵蛋白的N-末端片断可被优选使用。例如，可使用包含该蛋白N-末端前112个氨基酸残基的g p⁵⁵蛋白片段。然而，一般，该基因5'5'多肽包含该g p⁵⁵蛋白的N-末端至少前25个残基。

该中等大小的多肽在氨基酸长度上可从约20直到100，如，150，优选从约20到约50。中等大小多肽的例子包括降钙素，内啡肽，肠胃抑肽(gastric inhibitory peptide(s))，胰高血糖素，神经肽Y(neuropeptide)，生长激素释放因子(GHRF)，淀粉样β蛋白片断(amyloid β protein fragments)，水蛭素，胰岛素，生长激素抑制素，表皮生长因子，神经生长因子和PTH或其片断。可按本发明方法制备的尤其优选的中等大小多肽为具有天然氨基酸取代基的本发明化合物或其片断。

该基因5'5'-PTH融合蛋白容易包含一种在基因5'5'多肽与所

需的多肽之间的可裂解的链,优选地,该可裂解的链为化学可裂解的而更优选地是包含 A s p - P r o - P r o 或 A s n - G l y - P r o 氨基酸序列。

本发明的另一个方面,是提供一种编码融合蛋白的核苷酸序列,该融合蛋白含有一种 N - 末端噬菌体 T₄ 基因 55 多肽和一种与其 C - 末端相连的所需的中等大小的多肽。

该核苷酸序列优选地作为一种适于在细菌中表达的 D N A 序列。典型地,该序列包含编码一种在基因 55 与所需多肽的编码序列这间的裂解链的核苷酸。

本发明也提供一种包含一种编码该融合蛋白的 D N A 序列的细菌表达载体。

该表达载体一般除含有融合蛋白编码序列外,还含有适当的包括一种合适的启动子,一种操纵子和一种核糖体结合位点的表达控制序列和其它适当的调节序列。通常,表达载体也包含一种或多种可选择的标记物。

任何合适的启动子均可使用,如 T r p E, λ P₁, λ p r, L a c 或 T a c 启动子。优选的启动子为噬菌体 T₇ 启动子和表达载体为一种质粒。为了大肠杆菌表达,一种 R₁ 或 C o l - E₁ 质粒衍生的载体可被使用。例如,可使用从 Novagen 获得的表达载体 p E T 1 7 B 或类似的表达载体。

本发明另一方面提供由融合蛋白编码序列或如上所述的表达载体转化的细菌宿主细胞。尽管优选的宿主为大肠杆菌,例如,可使用大肠杆菌菌株 B L²¹ (D E₃) L y s⁻ E 和类似的菌株。但任何合适的细菌宿主均可使用。

有利地，融合蛋白以不溶性包含体的形式积累在宿主细胞中，并因此便于融合蛋白产物从细胞中的回收。为了从融合蛋白中获得所需多肽产物，溶解包含体蛋白，并将所需多肽产物与融合蛋白裂解。任何合适的变得可溶的处理均可使用，包括酸处理，如在约pH 2到4，优选用酸在约pH 2.5下处理，或用变性剂处理，如一种弱变性剂如盐酸胍。另外，需要从裂解后保留的产物中除去一种或多种不需要的N-末端氨基酸残基。

因此本发明更进一步的方面提供一种在细菌宿主中生产所需中等大小的多肽的方法，该方法包括：

引起转变的如上定义细菌宿主细胞以表达包含体形式的融合蛋白；

分离包含体；

使包含体变得可溶，并

从融合蛋白中裂解出所需多肽。

在一些中等大小的多肽的情况中，如PTH化合物，一般不需要仔细控制进行变性和复性的过程而获得活性形式的PTH产物，如具有PTH样活性。仅通过中和用于增溶的酸性条件可获得活性形式的中等大小多肽产物。融合蛋白的增溶和裂解可在一个步骤中进行。

本发明也包括一种融合蛋白，它含有N-末端噬菌体T₄基因55多肽和与其C-末端相连的所需的中等大小的多肽。

采用本发明的方法和载体，已经发现，产生高水平的中等大小的多肽，尤其是PTH产物是可能的。在大肠杆菌中，我们发现高达表达总蛋白约50%的蛋白为所需的融合蛋白。而且，融合蛋白形成易于从细胞其它成分中分离的包含体。再者，该包含体常由至少约90%的所需融合蛋白组成，从而能够显著减小所需要的纯化工作量。更进

一步，以融合蛋白形式的 P T H 产物的表达基本上减少了细菌细胞内内源多肽的过程，允许获得同源产物。

优选地，可裂解的链包含化学可裂解的与所需多肽相邻的氨基酸，通过简单的化学手段允许所需的多肽从融合蛋白上裂解。优选地，所需的多肽不含有化学可裂解的基团。

优选的化学可裂解的链包含氨基酸 A s p - P r o - P r o 或 A s n - G l y - P r o 。 A s p - P r o 或 A s n - G l y 键可分别来用酸条件如，甲酸（通常约 pH 2.5）或羟氨来进行化学裂解。然后将保留在所需多肽的 N - 末端的二肽 P r o - P r o 或 G l y - P r o 采用一种合适的二肽基肽酶来去除。例如，能使用 L.Lactis X-Pro 二肽基肽酶 E C 3.4.14.5。此肽酶描述在 Nardi 等，1991; Applied and Environmental Microbiology, 57, p45 to 50。

所需的多肽可在从融合蛋白中裂解后进行纯化。可使用 H P L C 纯化技术。纯化可在任何不需要的 N - 末端氨基酸残基除去前进行。

在实施例 308 到 314 中进一步说明本发明的方法。图 1 显示氨基酸序列和相应的克隆到质粒 p E T 1 7 B 中的截断的 g p 5 5 - A s p - P r o - P r o h P T H (1 - 3 8) O H 融合蛋白的 D N A 序列，和图 2 显示氨基酸序列和相应的克隆到质粒 p E T 1 7 B 中的全长 g p 5 5 - A s n - G l y - P r o - h P T H (1 - 3 8) O H 融合蛋白的 D N A 序列。

在下列实施例中，所有温度为℃。采用下列缩写。在本说明书中，没有更进一步指示的 P T H 一词包括羧基末端以及羧酰胺末端。

B O C = 叔丁氧基羰基

D M F = 二甲基甲酰胺

D C M = 二氯甲烷

F m o c = 9 - 芴基甲氧羰基

H o B t = 1 - 羟基苯并三唑

T F A = 三氟乙酸

T r t = 三苯甲氧基

R P - H P L C = 反相高效液相色谱层析

r . t . = 室温

D N P = 二硝基苯基

T o s = 甲苯磺酰基

D I P C = 二异丙基碳化二亚胺

P m c = 2, 2, 5, 7, 8 - 戊甲基苯并二氢吡喃 - 6 - 磺酰基

I p = 异丙基

F o r = 甲酰基

C p e = 1 - 氨基 - 环戊烷 - 1 - 羧酸

C p p = 1 - 氨基 - 环丙烷 - 1 - 羧酸

C h a = 环己基氨基丙酸

t B u = 叔丁基

实施例 1 : N^{α} - 异丙基 h P T H (1 - 3 4) NH_2

在聚苯乙烯基质的树脂载体上, 采用分段的方法装配此肽。用 B o c - 基保护 α - 氨基并且侧链官能基按下述被保护: L y s (2 - 氯苯甲基氧羰基), S e r (苯甲基), T h r (苯甲基), G l u (苯甲基), A s p (苯甲基), M e t (o), H i s (D N P), A r g (T o s), 和 T r p (H C O)。其它残基未被保护。

将氨基 - 4 - 甲基苯基 - 甲基 - 和 (聚苯乙烯 - 联乙烯基苯 = M

B H A - 树脂) (0 . 7 mmol / g) 进行下述 (1 7 至 (7)) 步骤的循环 :

- (1) D C M
- (2) 三氟乙酸 (5 0 %) 的 D C M 溶液
- (3) D C M
- (4) 二异丙基乙基胺 (1 0 %) 的 D M F 溶液
- (5) D M F
- (6) 在 D M F 中预先形成的 B o c - 氨基酸的对称酐 (每 g 起始树脂 1 . 4 mmol)
- (7) D M F

洗涤物和试剂的体积为每克起始树脂 5 至 2 0 ml。根据完成树脂反应 (步骤 2 . 4 . 6) 或从树脂中完全置换出先前的试剂 (步骤 1 . 3 . 5 . 7) 的需要, 每一步骤重复多次。每个循环后除去树脂样品, 并用茚三酮进行残留氨基的比色试验以检验偶合反应的完成。

在使用前通过将 B o c - 氨基酸 (每 g 树脂 2 . 8 mmol) 和 DCCl (每 g 树脂 1 . 4 mmol) 在含有完全溶解 B o c - 氨基酸的足够量的 D M F, 在 D C M 中反应制备 B o c - 氨基酸对称酸酐。过滤混合物, 在滤液中加入较多的 D M F, 在不超过 4 5 °C 的温度下蒸发挥发成分浓缩滤液, 所得溶液用于步骤(6)。

对每个氨基酸残基重复(1)至(7)的反应循环, 以提供出标题化合物的序列, B o c - G l n - O H 和 B o c - A r g (T o s) - O H 除外, 它们已在步骤(6)中偶合由于在 D M F 中它们已预先形成了 1 - 羧基苯并 - 三唑酯。

在室温下, 将充份装配的肽树脂用 2 0 ml 5 % 的苯硫酚的 D M

F 溶液处理二次，每次 1 小时，并用 DMF、甲醇和二氯甲烷洗涤。将肽树脂再次进行步骤(1)至(5)，接着按每克树脂加入 0.5 ml 丙酮，在 20 ml 的 DMF 中的 84 mg 氰基氢硼化钠和 0.2 ml 乙酸。在室温下 16 小时后，用 DMF 和二氯甲烷洗涤树脂并干燥。

根据例如在 International Journal of Peptide and Protein Research, vol.26, 262-273页 (1985) 中描述的“low-high”方法，用液态 HF，甲硫醚，对-甲酚和乙烷-1, 2-二硫醇处理肽树脂。除去挥发成分后，用乙酸乙酯洗涤。剩余物用几份 1% 乙酸提取，过滤并使滤液冻干。在十八烷基硅柱反相色谱上，用在 2% 磷酸或在 20 mM 磷酸四甲基铵中的梯度乙腈作为洗脱液，反复提纯冻干的产物，合并含有纯化合物的馏分，通过乙酸盐型的弱碱性的离子交换树脂过滤，冻干滤液得到标题化合物。

MS (离子-喷雾) : 4160

实施例 2 [Lys(N^E-异丙基)^{26,27}] hPTH (1-34) NH₂

如实施例 1 装配肽，但用 Lys (Fmoc) 使 13 位和 Fmoc-Ser (tBu) 在末端 1 位结合。

在室温下，将完全装配的肽树脂用 20 ml 5% 的苯硫酚的 DMF 溶液处理二次，每次 1 小时，并用 DMF，甲醇和二氯甲烷洗涤。如实施例 1 中所述将干燥的树脂用液体 HF 处理。裂解的产物 (350 mg) 悬浮于甲醇 (5 ml)，磷酸缓冲液 pH=5.0 (5 ml)，氰基硼氢化钠 (48 mg) 和丙酮 (0.28 ml) 的混合物中，在 RT 下反应 16 小时后，过滤反应混合物并蒸发滤液。将剩余物悬浮在 20% - 哌啶的 DMF 溶液中 15 分钟，用 20 体积的醚稀释并过滤。将剩余物溶解在 100 ml 水中，并加入乙酸到 pH=3，过滤并冻干滤液，在

十八烷基硅柱反相色谱上，用在 2 % 磷酸中的梯度的乙腈作为洗脱液，纯化冻干物。合并含有纯化化合物的馏分，通过乙酸盐型的弱碱性的离子交换树脂过滤，冻干滤液得到标题化合物。

MS (离子-喷雾) : 4 2 0 5 . 6 。

实施例3: N^α - 异丙基 [Lys (N^E-异丙基)^{13,26,27}] hPTH-(1-38)-OH

a) 固相肽合成

在聚苯乙烯基的树脂载体上，以分段的方法合成肽，用 Fmoc 保护 α - 氨基且侧链的官能基团如下述被保护：Asp(OtBu)，Glu (OtBu)，His(Trt)，Lys(Boc)，Asn(Trt)，Gln(Trt)，Arg(Pmc) 和 Ser(tBu)。其它的氨基酸未被保护。

将酯化到 4 - 羟甲基 - 苯氧甲基 - 和 (聚苯乙烯 - 1 % - 联乙烯基苯) 的 Fmoc-Gly, 0.5 mmol/g 用作分段固相合成的起始产物，其中包括 α 氨基酸去保护，洗涤，偶联 (新氨基酸的连接) 和洗涤的重复的循环。采用 D I P C 使三至五倍过量的 Fmoc-氨基酸偶联成预制的 HoBt-酯。用 D I P C 使 Fmoc-Arg (Pmc)，Fmoc-Asn(Trt) 和 Fmoc-Gln(Trt) 偶联成对称的酐。将肽链全部装配后，用 2 0 % 的哌啶 / D M F 除去 Ser¹ 的 Fmoc-保护基。通过在室温下用 1 0 % 乙二硫醇，苯硫基甲醚，甲苯硫酚和水在 9 0 % T F A 中的混合物处理肽树脂三小时，从苯乙烯树脂上的裂解出肽并且，除去侧链上所有保护基。过滤树脂颗粒并用一些 T F A 洗涤。通过加入醚，产物从合并的滤液中沉淀出，过滤并干燥。在 C - 1 8 硅柱色谱上，用梯度的乙腈的 2 % H₃ P O₄ / 水溶液洗脱，纯化产物。收集含有纯化化合物的组分，通过离子交换树脂 (Biorad, AG 4-X4, 100-200 目乙酸酯型) 过滤，冷冻得到 h P T H - (1 - 3 8) - O H。

b) 烷基化

将 40 mg (9 μ mol) hPTH-(1-38)-OH (445.8 g/mol) 溶解于 1.2 ml 甲醇, 1.2 ml 磷酸缓冲液 (Merck no. 9887 调节到 pH 5.0), 45 mg (716 μ mol) NaBH₃CN (62.84 g/mol) 和 0.8 ml (11 mmol) 丙酮 (73.52 ml/mol)。中在 C-18 硅胶上的反应通过 RP-HPLC 监控, 在室温下 15 小时后完成。用水稀释反应混合物, 且在 C-18 硅胶色谱上用梯度的乙腈的 2% H₃PO₄/水溶液洗脱。收集含有该纯化化合物的馏分, 用离子交换树脂 (乙酸酯型) 过滤, 冻干得到作为聚乙酸酯, 聚水合物的标题化合物。

$[\alpha]_D = -5.7^\circ$ (c = 0.317 在 95% AcOH 中)

MS (离子-喷雾): 4626

实施例 4: N^α 甲基 [Ala¹]PTH-(1-38)-OH

如实施例 3a 中的相同方法装配肽链, 在 1 位代替 Fmoc-Ser(tBu)-OH 的非天然氨基酸 Fmoc-N^α-甲基-Ala-OH 与肽树脂偶联。如实施例 3a 中所述进行裂解, 去保护和纯化。

MS (离子喷雾) = 4455, 91

实施例 5: [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Phe²³,

His²⁵, His²⁶, Leu²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH

采用与实施例 3a 相似的方法制备此肽。代替 Fmoc-Gly 酯化成 4-羟甲基-苯氧甲基-共 (聚苯乙烯-联乙烯苯) 所采用的相应的 Fmoc-氨基酸, 例如, Fmoc-Ala, Fmoc-Phe, Fmoc-D-Ala, Fmoc-D-Phe, 等。附加的侧链官能基团如下述被保护: Thr (叔-丁基), Trp (Boc) 和 Tyr (叔-丁基)。

采用相应的起始物，重复实施例 3 和 5 公开的方法，可以获得下述化合物：

- 实施例 6: [Leu⁸, Asp¹⁰, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³]hPTH(1-34)OH
实施例 7: [Ile¹]hPTH(1-38)OH (IS-MS: 4484)
实施例 8: [Ala¹, Abu²]hPTH(1-38)OH (IS-MS: 4428)
实施例 9: [Ala¹, Nva²]hPTH(1-38)OH (IS-MS: 4442)
实施例 10: [Ala¹, Ile²]hPTH(1-38)OH (IS-MS: 4456)
实施例 11: [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, His²⁶, Leu²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
实施例 12: [N-MeAla¹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4286)
实施例 13: [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4235)
实施例 14: [Thr¹]-hPTH-(1-38)OH (IS-MS: 4472)
实施例 15: [Leu¹]-hPTH-(1-38)OH (IS-MS: 4484)
实施例 16: [Abu¹]-hPTH-(1-38)OH (IS-MS: 4456)
实施例 17: [Gaba¹]-hPTH-(1-38)OH (IS-MS: 4456)
实施例 18: [Leu⁸, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH
实施例 19: [Leu⁸, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Arg²²]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4347)
实施例 20: [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]-hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4007)
实施例 21: [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3906)
实施例 22: [Leu⁸, Ala¹³, Gln¹⁸, Gln²⁶, Phe²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
实施例 23: Ip-[Leu⁸, Lys(Ip)¹³, Gln¹⁸, Lys(Ip)^{26, 27}, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4175)
实施例 24: Ip-[Leu⁸, Ala¹³, Gln¹⁸, Gln²⁶, Phe²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
实施例 25: [Gln¹⁶]hPTH(1-38)OH
实施例 26: [Ser¹⁴]hPTH(1-38)OH

- 实施例27:** [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, His²⁵, His²⁶, Leu²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例28:** [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Gln²⁶, Phe²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例29:** [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
(IS-MS: 3965)
- 实施例30:** [Leu⁸, Gln¹⁸, Ala²⁹, Glu³⁰, Ile³¹]hPTH(1-34)OH
- 实施例31:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH
- 实施例32:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ser¹⁴, Ile¹⁵, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹]hPTH(1-36)OH
- 实施例33:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Leu¹⁸]hPTH(1-36)OH
- 实施例34:** [Leu⁸, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹]hPTH(1-36)OH
- 实施例35:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁷, Leu¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4252)
- 实施例36:** [Leu⁸, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例37:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
(IS-MS: 4022)
- 实施例38:** [Leu⁸, Ala¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
- 实施例39:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Ala¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
- 实施例40:** [Leu⁸, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例41:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4077)
- 实施例42:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
(IS-MS: 4181)
- 实施例43:** [Leu⁸, Ala¹⁶, Asp¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4193)
- 实施例44:** [Leu⁸, Ala¹⁶, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4149)
- 实施例45:** [Leu⁸, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
- 实施例46:** [Leu⁸, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²²]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4219)
- 实施例47:** [Leu⁸, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3960)

- 实施例48:** [Leu⁸, Gln¹⁶]hPTH(1-36)OH
- 实施例49:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]
hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3980)
- 实施例50:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH
(IS-MS: 4240)
- 实施例51:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]
hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3923)
- 实施例52:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH
(IS-MS: 4225)
- 实施例53:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³]
hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3999)
- 实施例54:** [Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, His²⁶, Leu²⁷, Thr³³]
hPTH(1-34)OH
- 实施例55:** [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²²]hPTH(1-36)OH
- 实施例56:** [Ile¹⁵]hPTH(1-38)OH
- 实施例57:** [Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²², His²⁶, Leu²⁷,
Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例58:** [Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Arg¹⁹, His²⁶, Leu²⁷, Thr³³,
Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例59:** [Leu⁸, Ser¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²²]hPTH(1-36)OH
- 实施例60:** [Leu⁸, Ala¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²⁶, Arg²⁷]
hPTH(1-36)OH
- 实施例61:** [Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, His²⁶, Leu²⁷, Arg³³,
Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例62:** [Leu⁸, Ala^{16, 17, 18, 19}]hPTH(1-36)OH
- 实施例63:** [Leu⁸, Ala¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Gln²⁶, Phe²⁷]
hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4127)
- 实施例64:** Ip-[Leu⁸, Ala¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Gln²⁶, Phe²⁷]
hPTH(1-36)OH
- 实施例65:** Ip-[Leu⁸, Lys(Ip)¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹,
Lys(Ip)^{26, 27}]hPTH(1-36)OH
- 实施例66:** [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4166)
- 实施例67:** Ip-[Leu⁸, Lys(Ip)¹³, Ala¹⁶, Ala¹⁷, Ala¹⁸, Ala¹⁹,
Lys(Ip)^{26, 27}]hPTH(1-36)OH

- 实施例68: [Aib³, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4283)
- 实施例69: Ip-[Leu⁸, Asp¹⁰, Lys(Ip)^{11, 13, 26, 27}, Gln¹⁸]
hPTH(1-36)OH
- 实施例70: Ip-[Leu⁸, Ser¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²²,
Lys(Ip)^{26, 27}]hPTH(1-36)OH
- 实施例71: [Leu⁸, Tyr¹⁸]hPTH(1-36)OH
- 实施例72: [Ser³³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例73: [Thr³³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例74: [Leu³³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例75: [Gly³³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例76: [Leu⁸, His¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例77: [Leu⁸, Gly¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例78: [Leu⁸, Glu¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例79: [Leu⁸, Thr¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例80: [Leu⁸, Gln¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例81: [Gln³³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例82: [Leu⁸, Tyr¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
- 实施例83: [1-amino-cyclopentane-1-carboxylic
acid¹, Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
- 实施例84: [1-amino-cyclopentane-1-carboxylic acid¹, Leu⁸,
Ala^{13, 16}, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg^{26, 27}]hPTH(1-36)OH
- 实施例85: [1-amino-cyclopentane-1-carboxylic acid³, Gln¹⁸]
hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4309)
- 实施例86: [Arg¹²]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例87: [Ser¹²]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例88: [Cys¹³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例89: [Ile¹³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例90: [Asn¹³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例91: [Trp¹³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例92: [Asp¹³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例93: [Val¹³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例94: [Thr¹³]-hPTH-(1-38)-OH
- 实施例95: [Ser¹³]-hPTH-(1-38)-OH

实施例96 : [Tyr¹³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例97 : [Met¹³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例98 : [Gln¹³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例99 : [Leu¹³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例100 : [Ala¹³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例101 : [Gly¹³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例102 : [Val¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
实施例103 : [Ala¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
实施例104 : [Lys¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
实施例105 : [Arg¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
实施例106 : [Thr¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
实施例107 : [Ile¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
实施例108 : [Tyr¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
实施例109 : [Tyr¹⁵]-hPTH-(1-38)-OH
实施例110 : [Arg¹⁵]-hPTH-(1-38)-OH
实施例111 : [Val¹⁵]-hPTH-(1-38)-OH
实施例112 : [Lys¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
实施例113 : [Ser¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
实施例114 : [Leu¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
实施例115 : [Ala¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
实施例116 : [Gly¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
实施例117 : [Ala¹⁷]-hPTH-(1-38)-OH
实施例118 : [Met¹⁷]-hPTH-(1-38)-OH
实施例119 : [Ile¹⁷]-hPTH-(1-38)-OH
实施例120 : [Ser¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例121 : [Lys¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例122 : [Leu¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例123 : [Ala¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例124 : [Tyr¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例125 : [Met¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例126 : [His¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例127 : [Val¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例128 : [Gly¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例129 : [Pro¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH

实施例130: [Asp¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例131: [Ile¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例132: [Val¹⁹,Gln²⁴]-hPTH-(1-38)-OH
实施例133: [Arg¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例134: [Phe²⁰]-hPTH-(1-38)-OH
实施例135: [Ala²¹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例136: [Gly²¹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例137: [Phe²¹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例138: [Leu²¹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例139: [Asn²¹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例140: [Gln²¹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例141: [Ser²¹]-hPTH-(1-38)-OH
实施例142: [Gly²²]-hPTH-(1-38)-OH
实施例143: [Leu²²]-hPTH-(1-38)-OH
实施例144: [His²²]-hPTH-(1-38)-OH
实施例145: [Ala²²]-hPTH-(1-38)-OH
实施例146: [Ile²²]-hPTH-(1-38)-OH
实施例147: [Val²²]-hPTH-(1-38)-OH
实施例148: [Ser²²]-hPTH-(1-38)-OH
实施例149: [Arg²²]-hPTH-(1-38)-OH
实施例150: [Arg²⁶]-hPTH-(1-38)-OH
实施例151: [Val²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
实施例152: [Ile²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
实施例153: [Leu²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
实施例154: [Arg²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
实施例155: [Ala²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
实施例156: [Val²⁸]-hPTH-(1-38)-OH
实施例157: [Ile²⁸]-hPTH-(1-38)-OH
实施例158: [Pro³,Thr³³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例159: [Arg³³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例160: [Pro³³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例161: [Asp³³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例162: [Ile³³]-hPTH-(1-38)-OH
实施例163: [Lys³³]-hPTH-(1-38)-OH

实施例 1 6 4 : [I l e ³¹, A r g ³³] - h P T H - (1 - 3 8)
- O H

实施例 1 6 5 : [1 - 氨基环戊烷 - 1 - 羧酸¹] h P T H - (1 -
3 6) N H ₂

在聚苯乙烯基质的树脂载体上, 以分段的方法装配肽。用 Fmoc-基团保护 α 氨基

侧链的官能基团如下被保护 Arg(Pmc), Asn(Trt), Asp(OtBu), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc) 和 Tyr(tBu), 其它氨基酸未被保护。

可制备的 4 - (2', 4' - 二甲氧苯基 - Fmoc - 氨基 - 甲基) 苯氧 - 共 (聚苯乙烯 - 联乙烯苯), 0.4 mmol/g, 例如, 如 Tetrah. Letter, 28, 3787-3790(1980) 中所述, 进行下述循环步骤(1)至(5)的处理。

(1) D M F

(2) 哌啶 (2 0 %) 的 D M F 溶液

(3) D M F

(4) H O B T, 二异丙基碳化二亚胺, 和 Fmoc- 氨基丙酸的混合物 (每克起始树脂各 0.8mmol)

(5) D M F

洗涤和试剂的体积是每克起始树脂 5 至 2 0 ml

在下一个处理(1)至(5)的循环中, 用 Fmoc- 缬氨酸代替 Fmoc- 氨基丙酸, 而且如此进行各个循环使得, 在树脂上装配标题化合物的正确的氨基酸序列。

按需要的次数重复各步骤使之完成该残基的反应 (步骤 2, 4) 或完成从树脂中置换先前的反应物 (步骤 3, 5)。每个循环后除去树脂样品, 并用茚三酮进行残留氨基的比色试验检验偶合反应的完成。

在结束合成的最后循环中, 仅进行步骤(1)至(3), 并用 2 - 丙醇, 然后用甲醇和二氯甲烷 (1 : 1 v / v) 的混合物洗涤肽树脂, 在真空干燥器中充分干燥。

在室温下将肽树脂 (1 g) 悬浮在三氟乙酸, 水, 和 1, 2 - 乙烷二硫醇 (9 0 : 5 : 5 v / v) 的混合物 (2 0 ml) 中 2 小时, 过滤掉树脂颗粒并用少量的 T F A 洗涤。加入乙醚 (2 0 体积) 使产物从合并的滤液中沉淀出, 过滤, 用较高的乙醚洗涤并干燥。将剩余物

溶于2%乙酸中，在冻干前，使溶液在室温下静置8小时。冻干物在C-18硅柱色谱上用梯度的乙腈的2% H_3PO_4 溶液洗脱，用HPLS分析检测各组分，收集含有纯化合物的组分，用乙酸酯型阴离子交换树脂过滤上述馏分，并冻干得到如聚乙酸酯，多水合物的标题化合物。

例如，可如G. Valle等人，1988，在Can.J. Chem. 66: 2575-2582中所述，制备用于制备肽树脂的中间体Fmoc-1-氨基环戊烷-1-羧酸。

MS (离子-喷雾): 4312

实施例166: [1-(1-氨基环丙烷-1-羧酸)hPTH(1-36)]NH₂

采用相似于实施例165的方法制备上述肽。例如，可如M. Crisma等人(1989)在Int. J. Biol. Macromol. 11:345-352中所述，制备用于制备肽树脂的中间体Fmoc-1-氨基环丙烷-1-羧酸。MS (Ion-Spray): 4283。

采用相应的起始物，重复实施例165描述的方法，可以获得下述化合物：

实施例167: [D-Pro¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例168: [Nva¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例169: [N-Me-Ser¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例170: [Indole-2-carboxylic acid¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例171: [Indole-3-carboxylic acid¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例172: [Pyridine-3-carboxylic acid¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例173: [Pyridine-2-carboxylic acid¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例174: [Hexahydropyridazine-3-carboxylic acid¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例175: [Morpholine-2-carboxylic acid¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例176: [Pro¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例177: [Leu¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例178: [Ile¹]hPTH(1-36)NH₂

实施例179: [Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)NH₂

实施例180: [Nva⁸]hPTH(1-36)NH₂

实施例181: [Gln¹⁸]hPTH(1-36)NH₂

实施例182: [Tyr¹⁸]hPTH(1-36)NH₂

实施例183: [Lys¹⁸]hPTH(1-36)NH₂

实施例184: [Ala¹⁸]hPTH(1-36)NH₂

实施例185: [Phe²³, His²⁵, His²⁶, Leu²⁷]-hPTH(1-34)NH₂

实施例186: [Phe²³]-hPTH(1-36)NH₂ (IS-MS: 4247)

- 实施例187:** [Phe²³, His²⁵, His²⁶, Leu²⁷, Ile²⁸, Ala²⁹, Glu³⁰, Ile³¹, Thr³³, Ala³⁴]-hPTH(1-34)NH₂ (IS-MS:3934)
- 实施例188:** [Ala²⁹]-hPTH(1-36)NH₂ (IS-MS: 4248)
- 实施例189:** [Ala³⁴]-hPTH(1-36)NH₂ (IS-MS: 4210)
- 实施例190:** [Gln²⁵]-hPTH(1-36)NH₂
- 实施例191:** [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Thr³³, Ala³⁴]-hPTH(1-34)NH₂
- 实施例192:** [Ala¹, His⁵, Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Thr³³, Ala³⁴]-hPTH(1-34)NH₂
- 实施例193:** [Ser¹⁴, Ile¹⁵, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]-hPTH(1-34)NH₂
- 实施例194:** [D-Phe³⁴, D-Ala³⁶]-hPTH(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4290]
- 实施例195:** [Ala³]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS):4271]
- 实施例196:** [D-Ser³]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS):4290]
- 实施例197:** [D-Glu⁴]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS):4290]
- 实施例198:** [D-His⁹]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS):4286]
- 实施例199:** [Ala¹⁰]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS):4243]
- 实施例200:** [D-Asn¹⁰]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
- 实施例201:** [Ala¹²]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4299]
- 实施例202:** [Gln¹³]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4287]
- 实施例203:** [His¹³]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4296]
- 实施例204:** [Leu¹³]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4371]
- 实施例205:** [Ala¹³]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4228]
- 实施例206:** [Ala¹³, Gln²⁶, Phe²⁷, D-Phe³⁴, D-Ala³⁶]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4249]
- 实施例207:** [Ala¹⁴]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4219]
- 实施例208:** [D-His¹⁴]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
- 实施例209:** [D-Asn¹⁶]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4284]
- 实施例210:** [Ala¹⁷]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4270]
- 实施例211:** [D-Ser¹⁷]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
- 实施例212:** [Ala¹⁹]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4228]
- 实施例213:** [D-Glu¹⁹]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
- 实施例214:** [Ala²¹]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4257]
- 实施例215:** [Ala²²]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4227]
- 实施例216:** [Gln²⁶]-hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4287]

实施例217: [Nle²⁶]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4271]
 实施例218: [D-Lys²⁶]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
 实施例219: [Nle^{8, 18, 27}]hPTH(1-36)NH₂
 实施例220: [His²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4294]
 实施例221: [Phe²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4304]
 实施例222: [Nle²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4271]
 实施例223: [Asn²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4271]
 实施例224: [Ala²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4228]
 实施例225: [D-Gln²⁹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4289]
 实施例226: [D-Asp³⁰]hPTH(1-34)NH₂ [MS(IS): 4118]
 实施例227: [Ala³⁰]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4241]
 实施例228: [D-Val³¹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4290]
 实施例229: [Ala³¹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4258]
 实施例230: [Lys³²]hPTH(1-34)NH₂ [MS(IS): 3832]
 实施例231: [D-His³²]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
 实施例232: [Ala³²]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4219]
 实施例233: [D-Asn³³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
 实施例234: [Ala³³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4210]
 实施例235: [NMePhe³⁴]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4301]
 实施例236: [D-Asp³⁰]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4290]
 实施例237: Ip-[Nle^{8, 18}, Lys(Ip)^{13, 26, 27}, D-Asn³³, D-Phe³⁴]
 hPTH(1-34)NH₂
 实施例238: Ip-[Nle^{8, 18, 27}, Lys(Ip)^{13, 26}]hPTH(1-36)NH₂
 实施例239: [Nle^{8, 18}, D-Asn³³, D-Phe³⁴]hPTH(1-34)NH₂
 [MS(IS): 4080]
 实施例240: [Lys(Ip)¹³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4331]
 实施例241: Propargyl-[A¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 实施例242: [Ala⁰]-hPTH-(1-36)-NH₂
 实施例243: [Pro⁰]-hPTH-(1-36)-NH₂
 实施例244: Acetyl-hPTH-(1-36)-NH₂
 实施例245: [HyPro¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 实施例246: N-Dimethyl-[Ala¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 实施例247: [D-Ser¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
 实施例248: [Lys(For)¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4356]

实施例249: [D-Glyceric acid¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例250: [Asn¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例251: [4-Aminobenzoic acid¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例252: [4-Aminosalicylic acid¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例253: [TMSA¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4343]
实施例254: [Phe¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例255: [Propargylglycin¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例256: [Ala¹, His⁵, Leu⁶, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Phe²², Phe²³, His²⁵, His²⁶,
 Leu²⁷, Thr³³, Ala³⁴]-hPTH-(1-34)-NH₂
实施例257: [Abu²]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例258: [D-Val²]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例259: [tert-Leu²]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例260: [Ala¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例261: [D-Ile⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例262: [D-Gln⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例263: [D-Leu⁷]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例264: [Nle⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4268]
实施例265: [Phe⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4303]
实施例266: [Cha⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4309]
实施例267: [Leu⁸]-hPTH-(1-38)-NH₂
实施例268: [D-Leu¹¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4287]
实施例269: [Ala¹¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4244]
实施例270: [D-Lys¹³]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例271: [D-Leu¹⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例272: [Ala¹⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4243]
实施例273: [Ala¹⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4243]
实施例274: [Met(O₂)¹⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4320]
实施例275: [Nle¹⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4268]
实施例276: [D-Met¹⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例277: [Lys²⁰]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4259]
实施例278: [D-Arg²⁰]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例279: [D-Val²¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例280: [Trp(SO₂Pmc)²³]-hPTH-(1-38)-NH₂ [MS(IS): 4723]
实施例281: [Trp(Pmc)²³]-hPTH-(1-38)-NH₂ [MS(IS): 4660]

实施例282: [D-Trp²³]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例283: [Ala²³]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4171]
实施例284: [D-Leu²⁴]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例285: [Phe²⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4277]
实施例286: [Lys²⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4258]
实施例287: [Ala²⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4201]
实施例288: [Ala²⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4229]
实施例289: [Lys^{26/27}(For)]-hPTH-(1-34)-NH₂
实施例290: [D-Lys²⁷]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例291: [D-Leu²⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例292: [D-Phe³⁴]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
实施例293: [D-Val³⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例294: [Ala³⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例295: [Pro³⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例296: [NMeVal³⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例297: [Thr³⁵, Ala³⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例298: [D-Ala³⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂
实施例299: [NMeAla³⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂

实施例 3 0 0: (5 - 氨基 - 4 - 氟 - 2 - 异丙基) - 己 - 3 - 烯酰
- h P T H (3 - 3 6) N H₂

a) h P T H - (3 - 3 6) - N H - 树脂的制备

采用相似于实施例 1 6 5 中的方法制备此中间体。

b) [5 - 氨基 - 4 - 氟 - 2 - 异丙基) - 己 - 3 - 烯酰] h P T H
 (3 - 3 6) - 酰胺。

用 D M F 处理上述 a) 中得到 2 0 4 . 6 mg Fmoc-h P T H (3
 - 3 6) - N H - 树脂 5 分钟。然后用异丙醇和 D M F 洗涤几次。用
 D M F / 哌啶 8 : 2 处理 1 0 分钟, 以除去 Fmoc- 保护基。在 0 .
 7 ml D M F 中, 将去保护的 P T H - 片段, 3 8 . 1 mg 的 4 - 氟 -

2-异丙基-5-叔-丁氧羰基氨基-己-3-烯酸, 68.7 mg 苯并三唑-1-基氧三(吡咯烷)磷鎓六氟磷酸盐(PyBOP)和26.6 mg 4-甲基吗啉振荡80分钟。用异丙醇和DMF洗涤几次后, 用4.5 ml TFA / 0.25 ml 水 / 0.25 乙烷二硫醇处理固体剩余物55分钟。然后过滤混合物, 加入二乙醚使标题化合物从所剩溶液中沉淀出。用制备HPLC(Vydac 柱, 梯度A = 水, B = 7 乙腈 / 3 水 / 0.2 磷酸)纯化标题化合物。

MS(离子-喷雾): 质量4272

$[\alpha]_{365\text{nm}}^{\text{Hg}} = -66.8^\circ$ (C = 0.25 在95% ACOH中)

实施例301: 4-氟-2-异丙基-5-叔丁氧羰基氨基-己-3-烯酸酯

a) (s)-3-(1-氧(4-氟-3-羟基-2-异丙基)己-4-烯基)-4-苯基甲基-2-噁唑烷酮

采用相似于D. A. Evans 等人, Org. Synth. 68, 1990 所述的方法, 以(s)-3-(1-氧异丙基)-4-苯基甲基-2-噁唑烷酮和2-氟-丁-2-烯醇起始制备标题化合物。

MS(FAB): MH^+ 350

b) (s)-3-(1-氧代(4-氟-3-O-(2,2,2-三氯乙烷亚胺)-2-异丙基)己-4-烯基)-4-苯基甲基-2-噁唑烷酮

将1.5 g 实施例301 a) 化合物溶于6 ml DCM中。在0°加入0.0958 ml 1.8-二氮杂双环(5,4,0)十一-7-烯(DBU)。在0℃向此溶液滴加入0.475 ml 三氟乙腈的2 ml DCM溶液。一小时后蒸发反应混合物, 剩余物用硅胶柱色谱

(己烷/乙醚 2 : 1) 纯化。MS (FAB) : MH^+ 493

c) (s) - 3 - (1 - 氧化 (4 - 氟 - 5 - N - 2 , 2 , 2 - 三氟乙酰基氨基 - 2 - 异丙基) 己 - 3 - 烯基) - 4 - 苯基甲基 - 2 - 噁唑烷酮

将 2 g 化合物 301 (b) 溶于 150 ml 邻 - 二甲苯中, 并在 160 ° 搅拌 3 小时, 然后除去邻 - 二甲苯, 剩余物在硅胶柱色谱 (甲苯 / 乙酸乙酯 98 : 2) 上纯化。

MS (FAB) : MH^+ 493

d) 4 - 氟 - 5 - N - 2 , 2 , 2 - 三氟乙酰基氨基 - 2 - 异丙基 - 己 - 3 - 烯酸

采用相似于 D . A . Evans 等人 Org. Synth. 68 1990 所述的方法, 以化合物 301 c) 为起始物制备标题化合物。

MS (FAB) : MH^+ 335

e) 5 - 氨基 - 4 - 氟 - 2 - 异丙基 - 己 - 3 - 烯酸

将 899 mg 的化合物 301 d) 溶于 20 ml 乙醇中, 加入 13.5 ml 6 N 的氢氧化钠溶液。在室温下搅拌此混合物 20 小时。除去乙醇, 剩下的液体组分用 2 N HCl 酸化到 pH = 2, 并用正 - 丁醇撮。蒸发提取物, 剩余物通过硅胶 (DCM / 甲醇 1 : 1) 过滤, 由此获得纯的标题化合物。

MS (FAB) : MH^+ 190

f) 4 - 氟 - 2 - 异丙基 - 5 - 叔丁氧羰基氨基 - 己 - 3 - 烯酸

将 0.56 g 化合物 301 e) 溶于 12 ml 水中并加入 1.5 g 碳酸钠。对此溶液加入溶于 12 ml 四氢呋喃的 0.4 g 二叔丁基碳酸酯。在室温下搅拌此混合物 18 小时。然后加入 50 ml 正 - 丁醇

和 50 ml 水，并在剧烈搅拌下加入 1 N HCl 直至 pH = 2。蒸发有组分，剩余物用硅胶柱色谱（己烷/丙酮 1 : 2）提纯。

MS (FAB) : MH^+ 290

$[\alpha]_D = -61.3^\circ$ (1% 在甲醇中)

重复上述方法，并用相应的起始物制备下述化合物：

4-氟-2-甲基-5-叔丁氧羰基氨基-己-3-烯酸

4-氯-2-甲基-5-叔丁氧羰基氨基己-3-烯酸

4-氟-2-苯甲基-5-叔丁氧羰基氨基-己-3-烯酸

4-氯-2-异丙基-5-叔丁氧羰基氨基-己-3-烯酸

4-甲基-2-异丙基-5-叔丁氧羰基氨基-己-3-烯酸

实施例 302

采用上述实施例 300 的方法，但用适当的起始物可制备下述化合物：

-(5-氨基-4-氟-2-甲基)-己-3-烯酰基-hPTH
(3-36) 酰胺

MS (离子-喷雾) : 质量 4245

-(5-氨基-4-氯-2-甲基)-己-3-烯酰基-hPTH
(3-36) 酰胺

MS (离子-喷雾) : 质量 4260

-(5-氨基-4-氟-2-苯甲基)-己-3-烯酰基-hPTH
(3-36) 酰胺

MS (离子-喷雾) : 质量 4320

-(5-氨基-4-氯-2-异丙基)-己-3-烯酰基-hPTH
(3-36) 酰胺

MS (离子-喷雾) : 质量 4 2 8 9
- (5-氨基-4-甲基-2-异丙基)-己-3-烯酰基-
h P T H (3-36) 酰胺

MS (离子-喷雾) : 质量 4 2 6 9

实施例 3 0 3

采用上述实施例 3 0 0 的方法, 但用适当的起始物, 可制备下述化合物:

- a) (5-氨基-3-氮杂-2-异丙基)-己酰基-h P T H (3-36)-酰胺 [MS (离子-喷雾) : 4 2 5 7] 使用的起始物: (4-氮杂-2-叔丁氧羰基氨基-5-异丙基)-己酸
- b) (5-氨基-3-氮杂-3-N-乙酰基-2-异丙基)-己酰基-h P T H (3-36)-酰胺 [MS (离子-喷雾) : 4299] 使用的起始物: (4-氮杂-4-N-乙酰基-2-叔丁氧羰基氨基-5-异丙基)己酸
- c) (5-氨基-3-氮杂-3-N-乙酰基)-己酰基-h P T H (3-36)-酰胺 [MS (离子-喷雾) : 4 2 5 7] 使用的起始物: (4-氮杂-4-N-乙酰基-2-叔丁氧羰基氨基)-己酸
- d) (5-甲基氨基-3-氮杂-2-异丙基)-己酰基-h P T H (3-36)-酰胺 [MS (离子-喷雾) : 4 2 7 1] 使用的起始物: [4-氮杂-2-(N-叔丁氧羰基, N-甲基氨基)-5-异丙基]-己酸
- e) (5-甲基氨基-3-氮杂-3-N-甲基-2-异丙基)-己酰基-h P T H (3-36)-酰胺 [MS (离子-喷雾) :

- 4 2 8 5] 使用的起始物：[4 - 氮杂 - 4 - N - 甲基 - 2 -
 (N - 叔丁氧羰基氨基，N - 甲基氨基) - 5 - 异丙基] - 己酸
- f) (5 - 氨基 - 3 - 氮杂 - 3 - N - 甲基 - 2 - 异丙基) - 己酰基
 - h P T H (3 - 3 6) - 酰胺 [M S (离子 - 喷雾) : 4271]
 使用的起始物：(4 - 氮杂 - 4 - N - 甲基 - 2 - 叔丁氧羰基氨基
 - 5 - 异丙基) - 己酸
- g) (5 - 氨基 - 3 - 氮杂 - 3 - N - 并丙基) - 己酰基 - h P T H
 (3 - 3 6) - 酰胺 [M S (离子 - 喷雾) : 4 2 5 7] 使用的
 起始物：(4 - 氮杂 - 4 - N - 异丙基 - 2 - 叔 - 丁氧羰基氨基
 - 5 - 异丙基) - 己酸
- h) [1 - 环戊烷 - 1 - 氨基 - 1 - 羧酸 (psi CH₂ - NH) - Val²]
 - h P T H (1 - 3 6) - 酰胺，采用 1 - 环戊烷 - 1 - 叔丁氧
 羰基氨基 - 1 - 羧酸 (psi CH₂ - NH) - Val - OH 作为起始物

实施例 3 0 4 :

采用上述实施例 3 a) 的方法，但用相应的起始物，可制备下述
化合物：

(5 - 氨基 - 3 - 氮杂 - 2 - 异丙基) - 己酰基 - [Leu⁸ , Ala⁶ ,
 Gln¹⁸ , Ala¹⁹) h P T H (3 - 3 6) OH [M S (离子 - 喷雾) :
 4 1 3 5] 使用的起始物：(4 - 氮杂 - 2 - 叔 - 丁氧羰基氨基) -
 己酸

实施例 3 0 5 : (4 - 氮杂 - 4 - N - 乙酰基 - 2 - 叔丁氧羰基氨基
 - 5 - 异丙基) - 己酸

a) 甲基 (4 - 氮杂 - 2 - 叔丁氧羰基氨基 - 5 - 异丙基) - 己酸

用 Lawesson-试剂 (S . - O . Lawesson, 等人, Tetrahedron

1981, 37, 3635) 处理 Boc-Ala-Val-OMe. 然后根据 F.S. Guziec 等人 THL, 1991, 23-26 所述的方法, 还原所得的内硫肽。

MS (EI) : MH^+ 289

b) (4-氮杂-4-N-乙酰基-2-叔丁氧羰基氨基-5-异丙基)己酸甲基酯

将 264 mg 的化合物 305 a) 溶于 5 ml DCM 然后加入 0.14 ml 三乙基胺和 0.072 ml 乙酰氯, 在 40° 搅拌此混合物 24 小时。加入 50 ml DCM 后, 用水洗涤溶液两次。干燥有机组分并蒸发。然后将获得的标题化合物用柱色谱 (己烷/乙酸乙酯 4 : 1) 纯化。

MS (EI) : M^+ 330

c) (4-氮杂-4-N-乙酰基-2-叔丁氧羰基氨基-5-异丙基)-己酸

将 356 mg 化合物 305 b) 溶于 4 ml 甲醇/水 3 : 1 中, 加入 53 mg 氢氧化锂。在 60° 搅拌此混合物二小时。然后加入 25 ml DCM 并在剧烈搅拌下加入 1 N HCl 直至 pH = 2。分离有机组分, 干燥并蒸发, 由此获得纯化的标题化合物。

MS (FAB) : MH^+ 317

重复此方法, 但采用合适的起始物, 获得下述化合物:

(4-氮杂-4-N-乙酰基-2-叔丁氧羰基氨基)己酸

(4-氮杂-2-叔丁氧羰基氨基-5-异丙基)-己酸

[4-氮杂-2-(N-叔-丁氧羰基, N-甲基氨基)-5-异丙基]-己酸

(4-氮杂-4-N-甲基-2-叔-丁氧羰基氨基-5-异丙

基)-己酸

(4-氮杂-4-N-异丙基-2-叔-丁氧羰基氨基-5-异丙基)-己酸

(4-氮杂-2-叔-丁氧羰基氨基)-己酸

实施例1至300和302至304的化合物,在氨基酸定量分析中,显示出正确的氨基酸比例。

下述的实施例说明了本发明的重组方法,如果不另外指明,采用 Ausubel 等人;在1991; Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 中所描述的常规方法

实施例306:克隆噬菌体T₄基因55

两个DNA片段,一个含有噬菌体T₄基因55的全部编码序列,另一个编码了它的一部分,用纯化的T₄ DNA作为模版,通过聚合酰链反应(PCR)使它们扩增。用含有Nde I或BamHI核内切酶识别序列的寡核苷酸作引物。用模版和100 pM的上游引物 (GAGGTGCATA TGTCAGAAAC TAAGCCT 27, NdeI识别位点由它的核苷酸7-12提供)和100 pM的下游引物 (GGTCGGATCC ATCGTTAGCG TTAGCCT CAT A T A A A A A T C 40, BamHI 的识别位点由核苷酸5-10提供)在100 μl反应缓冲液中,该缓冲液含有10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ 分别0.2 mM 的 dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 和 0.1% Triton X100, pH 为9.0进行PCR反应(25次循环,各为30" 94℃, 30" 50°, 30" 72℃)获得0.6 kb的段。基因55的平头形式是通过正如制备全部基因所描述的PCR法制备的,除了采用不同的寡核苷酸作为下游引

物 (GGTCGGATCC TACGTTGGAC GAATGCA T⁻²⁸, BamHI 识别位点由它的核苷酸 5-10 提供)。获得 0.35 kb 的片段。0.6 kb 和 0.35 kb DNA 片段用限制性核酸内切酶 NdeI/BamHI 消化, 并克隆到 NdeI/BamHI 消化的表达载体 pET17B (从 Novagen 获得) 中。0.6 kb DNA 片段编码了全部的 gp55 蛋白质 (188 氨基酸残基—见图 1), 而 0.35 kb 片段编码了 gp55 的 12 kD 氨基酸末端片段 (112 氨基酸残基—见图 2)。

实施例 307: 编码 PTH (1-38) DNA 的制备的克隆

通过 PCR, 采用克隆合成的 PTH (1-38) 编码序列作模版, 生成了编码了 a) 相应于图 1 的氨基酸残基 110-115 和 PTH (1-38) 的连接子肽, 或 b) 相应于图 2 的氨基酸 186-191 和 PTH (1-38) 的连接子肽的 DNA 片段。把编码连接子 a) 寡核苷酸 (GAGTGGATCC ATCGATCCAC CATCCGTATC AGAAATACAA CT⁴²), 或编码连接子 b) 的寡核苷酸 (GAGTGGATCC GTTAACGGTC CATCCGTATC AGAAATACAA CT⁴² 作为上游引物。下游引物 TCTACTCGAG TTAACC CAGA GCTACAAAAT TATG³⁴。每个上游引物与一个 BamHI 克隆位点结合且下游引物含有 XhoI 识别位点 (每个序列的核苷酸 5-10)。如实施例 306 所述的相同条件下进行 PCR 反应。用 BamHI 和 XhoI 裂解后, 将 0.14 kb PCR 产生插入到 BamHI-XhoI 消化的 gp55-pET17B 质粒中, 获得实施例 306。

为了表达该融合蛋白质, 所得质粒构建体转化到大肠杆菌 E. Coli

BL21 (DE3) LysE 中且单独的细菌克隆进一步繁殖。在 37 °C 在一个旋转振荡器上，在周期生长介质 (Bio 101) 中培养一种预培养物过夜，获得该融合蛋白的表达。用主培养体积的 1 - 5 % 产生的预培养物来接种主培养物。然后在 37 °C 温度，和 pH 6.9 至 7.1 下，同时以 1.0 l/min 充气并在 200 - 400 rpm 搅拌下发酵主培养物。当培养物 OD₅₅₀ 达到大约 1.0 至 5.0 时，加入 1 mM IPTG 诱发表达。诱发后发酵作用继续大约五小时，且然后不杀死大肠杆菌 E. coli 细胞，收获发酵肉汤。用管离心使收获的细胞转沉下，再悬浮在样品缓冲液中，用 SDS PAGE 测定表达。然后冷冻细胞沉淀物，直到纯化。此方法和采用的宿主细胞全部在 Studier 等人；

1990；“应用 T₇ RNA 聚合酶使克隆的基因直接表达”，Methods in Enzymology, Academic Press, 60 至 89 页中描述。

实施例 308：内含体的制备

将从实施例 307 获得的冷冻的大肠杆菌 E. coli 沉淀再次悬浮到 25 % w/v 缓冲液 A (50 mM Tris pH 8.0; 含有 2 mM DTT, 5 mM 苯甲脒-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.0 mM MnCl₂, 10 µg/ml DNA 酶和 2 mg/ml 溶菌酶) 中并在室温下伴随搅拌混合 1 小时。该再次悬浮的细胞通过 Manton-Gaulin 均浆器 (在 1200 bar 通过 2 次) 溶解并将所得的溶胞产物保持在冰中。用冰-冷却的缓冲液 B (50 mM Tris pH 8.0; 含有 2 mM DTT, 5 mM 苯甲脒-HCl 和 4 mM EDTA) 使溶胞产物稀释 2 倍，并在 27,500 g 离心 30 min。

细心除去离心的上清液并丢弃。沉淀物再次悬浮在 25 % w/v 的缓冲液 B 中，如前述再次通过 Manton-Gaulin 并离心。用缓冲液

B 重复此过程一次并用水重复一次。称重所得内含体沉淀物并冷冻到 -20°C 待用。

实施例 3 0 9 : gp55-Asp-Pro-Pro-(1-38)hPTH 内含

体的溶解和裂解

在实施例 3 0 8 获得的含有 gp55-Asp-Pro-Pro-(1-38)hPTH 的冷冻内含体悬浮于 10 mM HCl 酸性溶液 (分析纯) 中, 直至最后浓度为 $6\% \text{ w/v}$ 。在 50°C 温育溶液 24 小时, 加入 1 体积 100 mM NaOAc 水溶液使反应终止。在 $27,500\text{ g}$ 离心 30 分钟使稀释的上清液澄清并通过玻璃纤维滤器过滤。

实施例 3 1 0 : gp55-Asn-Gly-Pro-(1-38)hPTH 内含体的溶解和裂解

如实施例 3 0 8 获得的含有 gp55-Asn-Gly-Pro-(1-38)hPTH 冷冻内含体溶于 6 M 胍-HCl (含有 2 M 羟胺-HCl 并通过加入 4.5 M LiOH 使 pH 升至 9.0) 中, 得到大约 5 mg/ml 蛋白质。通过进一步加入 LiOH 使 pH 再调整至 pH 9, 并在 45°C 保温溶液 4 小时。加入甲酸至 pH 4 使反应中止, 如实施例 3 0 9 所述使溶液离心并过滤。

实施例 3 1 1 : Gly-Pro 和 Pro-Pro(1-38)hPTH 的制备 HPLC

在分析反相 HPLC (Orpogen HD-胶 - RP-7s-300; $4\times 150\text{ mm}$ 柱) 上分析过滤的裂解物的上清液, 并与已知 (1-38) hPTH 标准 (Ba chem) 比较以确定 PTH 浓度。柱用 $85\% \text{ HPLC 缓冲液 A}$ ($90\% \text{ 水}, 10\% \text{ 乙腈}; \text{含 } 0.1\% \text{ v/v TFA}$) 和 $15\% \text{ HPLC 缓冲液 B}$ ($10\% \text{ 水}, 90\% \text{ 乙腈}, \text{含 } 0.1\% \text{ TFA}$) 平衡并用 $15\% \text{ HPLC 缓冲液 B}$ 至 $100\% \text{ HPLC 缓冲液}$ 的梯度, 以流速为 0.75 ml

$/\text{min}$, 用超过 15 分钟的时间进行洗脱。

根据制剂的标准，上清液既可装入 $1.0 \times 2.5 \text{ cm C}_4$ Vydac 或装入 $2.2 \times 2.5 \text{ cm C}_4$ Vydac. 分别在流速 4 ml/min 和 10 ml/min , 用 $8.5\% \text{ HPLC}$ 缓冲液 A 和 $1.5\% \text{ HPLC}$ 缓冲液 B 平衡柱。分别用超过 80 ml 的 $1.5\% \text{ B}$ 至 $8.5\% \text{ B}$ 和超过 300 ml 的 $1.5\% \text{ B}$ 至 $5.5\% \text{ B}$ 对柱进行梯度洗脱。

手工收集 Gly-Pro-hPTH(1-38) 或 Pro-Pro-hPTH(1-38) 峰，然后在真空下除去乙腈，用分析 HPLC 确定裂解后和在收集组分中的肽浓度。

将除去溶剂的肽溶液用等体积的 100 mM 乙酸钠稀释并调节 pH，如果需要，调节至 $\text{pH } 5.4$ ，接着过滤 ($0.2 \mu\text{m}$)，将溶液装入阴离子交换柱 (或单 s 或 s p - 琼脂糖高效，分别装入 $\text{HR } 10/10$ 或 $\text{XK } 16/10$ 柱) 用 50 mM 乙酸钠 $\text{pH } 5.4$ (缓冲液 C) 平衡。用超过 7.5 柱体积的 0 至 500 mM NaCl 梯度的缓冲液 C 进行柱洗脱。收集 10 ml 组分并集中 X-X-(1-38) hPTH 峰，(如前述用 HPLC 确定肽浓度。

此柱适用于将肽交换到多种生理缓冲液中，且适用于除去融合蛋白质本身化学裂解生成的附加肽。

实施例 3.1.2: 从 X-X-(1-38) hPTH 上酶脱除去 XX

将实施例 3.1.1 中获得的集中的肽馏分 (浓度范围 $1.5 - 2.5 \text{ mg/ml}$) 通过加入固体 Tris 使 pH 为 8。加入纯化的胰氨酰基二肽酶 (在 $\text{PBS pH } 7.2$ 中 0.5 mg/ml) (Nardi 等人 (1991) App. Env. Microbiol, 57, No.1, 40-50) 至 $1:1000$ ，并把溶液在 37°C 温育 24 h 。加入 TFA ($\text{pH} = 5.0$) 至 0.2% 使反应终止，且所得产物 (1-38) hPTH 用制备 HPLC 分离 (采

用如实施例 3 1 1 所述的相同条件)。且除去等分的 N-末端序列后除去溶剂冻干，光谱分析质量。

采用相似如上所述方法，采用两个融合蛋白质所获得的产量实施例如下：

Gen55-Asp-Pro-Pro-(1-38)PTH (用平截形的 Gen55)

在部分最适发酵条件下，从 1 0 升发酵物中获得 2 1 5 g 湿细胞沉淀物。融合蛋白质的百分表达水平为大约 3 7 %，从此沉淀物中，分离出 3 1 g 的内含体。这些内含体蛋白质纯度(着眼于融合蛋白体)为 6 1 %。溶解，裂解和离心/过滤后，检测得大约 6 2 0 mg 的 Pro-Pro-PTH。继 C₄-Vydac HPLC 之后，该物质产生 5 8 0 mg Pro-Pro-PTH，将其稀释，在 Monos 上离子交换，用 X-脯氨酰基二肽酶(在 Pro-Pro-PTH 的浓度为 2 mg/ml)消化，HPLC 和冻干后，获得 4 4.0 mg 具有全部生理活性的冻干纯产物，停止裂解步骤和最终产物之间的产率为 7 1 %。

Gen55-Asn-Gly-Oro-(1-38)PTH (用“长”型的 Gen55)

从 2 0 升非最优的发酵物中，收获得具有 5 0 % 融合蛋白质表达的 7 8 g 湿细胞沉淀物，随后溶胞并离心，获得 1 8 g “9 0 % 纯”的内含体。接着用酸终止此步骤并离心/过滤，测得大约 4 7 0 mg Gly-Pro-PTH。在 C₄-Vydac 上 HPLC 后，测得 3 5 5 mg 肽，s p-琼酯糖离子-交换后，减少到 3 2 1 mg。在 2 mg/ml 进行酶促除去 Gly 和 Pro 残基。最后的 HPLC 步骤和冻干后，获得 2 4 4 mg 纯的，具有全部生理活性的 (1-38) PTH，从停止裂解反应步骤表示的产率为 5 2 %。

采用实施例 3 0 6 至 3 1 2 的方法，还可制备实施例 2 5，2 6，

56和86至164的化合物。

以游离形式或以适于药用的盐形式的本发明化合物和络合物，正如动物实验显示的具有有价值的药理学活性，且因之表现出疗效。

根据Marcus和Aurbach在Endocrinology, 85, 801-810 (1969)的方法，通过在离体测定本发明化合物在UMR 106-06小鼠和SaOS-2人体骨肉瘤细胞中刺激环AMP合成的能力，来评价它们的生物活性。在12孔盘的Eagle's 最少量必需介质-10% FCS中使小鼠骨肉瘤UMR 106细胞生长至融合。使人体SaOS-2骨肉瘤细胞在McCoy's 5A介质-10% FCS中生长。然后将此介质转换成2% FCS的介质，并加入1-5 μ Ci/孔[3H]-腺嘌呤，两小时后，细胞用无血清介质洗涤二次，并在含有1mM-3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤的DMEM-1% BSA中保温。以排除在磷酸二酶中的作用，20分钟后加入供试底物，15分钟后通过加入冰冷却的5%三氟乙酸使反应停止，并提取cAMP。加入含有5mM的未示踪腺嘌呤，腺苷，AMP，ADP，ATP，和cAMP以及0.4 μ Ci[14c]-腺苷的载体溶液(0.5ml/孔)以测定回收率。用系列的Dowex 50 W-X4(200-400目)和氧化铝色谱分离[3H]-cAMP并计数。以对照溶剂的%计算结果，并从DRC曲线上确定EC₅₀值。在 10^{-11} 至 10^{-6} M的浓度本发明化合物能够刺激UMR 106-06小鼠和SaOS-2人骨肉瘤细胞中产生cAMP。

本发明化合物还具有对PTH受体结合亲和力，例如，如下述：

用乳过氧化物酶方法(Anawa Lab, AG, Wangen)将鸡[Tyr³⁶]PTHrP(1-36)酰胺磺化成2,200Ci/mmol的特异性。

用含有 1% BSA 的 200 μ l DMEM 和 HAM's F12(1:1) 冲洗单层的肾细胞，并在 16 $^{\circ}$ C 与存在或不存在 1 μ M [Tyr 1] chPTHrP(1-36) 酰胺的每孔 50,000 cpm 的 [^{125} I-Tyr³⁶] chPTHrP(1-36) 酰胺培育。培育后，用 0.5 ml 介质 (4 $^{\circ}$ C) 冲洗细胞，用 0.5 ml 1 N NaOH 使细胞溶解并测定放射性。特异结合被定义为总结合减非特性性结合。采用 SCTFIT，一种非线性回归计算机程序 (Feyen 等人, 1992, Biochem, Biophys, Res, Commun. 197: 8-13) 分析竞争内点且数据用平均 pK_D 值 ($n = 2$ 至 3) 表示，在本试验中本发明化合物结合亲和性的平均 pK_D 值为 7 至 10。

进一步的，连续皮下注入后，本发明化合物可提高血浆钙水平，例如，测定甲状腺甲状旁腺切除的 140 至 170 g 雄性威斯特鼠在甲状腺甲状旁腺切除 5 天后，用 Alzet 小泵植入鼠颈，以 0.3 至 30 μ g/天/鼠的量输入供试化合物。在此后 1, 2, 3 和 6 天后的早晨后眶刺孔引出血液，且通过光度计测定血浆钙浓度，在本实验中本发明化合物提高了血钙浓度。

因此本发明化合物表现出预防或治疗与钙增加衰竭或吸收作用有关的，或需要钙固定在骨骼中的骨骼疾病，例如多种发生性（例如，由老龄或由皮质类固醇治疗或失活引起的少年性，绝经，绝经后，创伤后。）骨质疏松症，骨赘，包括与骨骼去矿质作用有关的急性和慢性骨病，骨软化，由关节炎或骨关节炎引起的牙周骨丧失，或用于治疗甲状旁腺机能减退。

本发明化合物特别适应于预防或治疗多种发生性骨质疏松症。

在上述所有用途中，本发明化合物适用的每日剂量范围在大约 0.003 至大约 10 mg，优选 0.003 至 3，更优选 0.01 至

1 mg。本发明化合物每天一次或一周内二次给药。

本发明化合物可以游离形式或以药用可接受的盐形式或配合物给药。上述盐和配合物可以按常规方法制备且具有如游离化合物相同等级的活性。本发明还提供了含有以游离碱形式或药用可接受的盐形式或配合物形式的本发明化合物，以及有关的药用可接受的稀释剂或载体的药用组合物。上述组合物可以常规方法配制。本发明化合物可以任何常规途径给药，例如以注射溶液或悬浮液形式肠胃外的途径，胃肠途径，例如口服，例如以片或胶囊形式或以透皮吸收的，鼻的或栓剂的形式给药。

根据如前面所述，本发明进一步提供了：

- a) 用作药物的本发明化合物或药用的盐或它们的配合物。
- b) 促进骨形成的方法，例如预防或治疗与钙增加衰竭或吸收作用有关的，或需要钙固定在骨骼中的所有的骨骼疾病，例如多发性（例如，由老龄或由皮质类固醇治疗或失活引起的少年性，绝经，绝经后，齿具备后）骨位疏松症，骨折，包括与骨骼去矿质作用有关的急性和慢性骨病，骨软化，由关节炎或骨关节炎引起的牙周骨丧失或骨丧失，或用于治疗甲状旁腺机能减退，该方法包括对所述的患者施用有效量的本发明化合物或药用的盐或它们的配合物；
- c) 用于制备上述方法 b) 中的药用组合物的本发明化合物或其药用的盐或配合物。

本发明进一步的实施例，本发明的化合物可以作为其它治疗的附加物或助剂，例如使用骨吸收抑制剂的治疗，例如骨质疏松症的治疗，特别是使用例如鲑，鳗类或人体降钙素的降钙素或它的类似衍生物的治疗，例如雌激素，部分雌激素激动剂或雌激素—孕激素结合物的类

固醇激素、磷酸氢盐、维生素 D 或它的类似物，或它们的任何组合。

与本发明化合物结合给药时，例如作为骨吸收抑制治疗助剂，联合给药的抑制剂的药剂当然地取决于使用的抑制剂药物的类型，例如是否是类固醇或降钙素，治疗的条件，是否作为医疗或预防性的治疗，食物疗法等等而变化。

根据前述的本发明进一步提供的方法为：

d) 促进骨形成的方法，例如预防或治疗钙缺失，例如预防和治疗本文前述的任何具体症状或疾病，在需要上述治疗的患者中，该方法包括对所述患者给药有效量的 a) 本发明化合物和 b) 第二种药物，所述第二种药物是例如如前述指示的骨吸收抑制剂。

实施例 20，29，37，49 和 50 的化合物是优选的。

图 1

AGATCTCGAT CCCGCGAAT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCACAAC GGTTTCCCTC	60
TAGAAATAAT TTTGTTTAACT TTTAAGAAGG AGATATACAT ATG TCA GAA ACT AAG	115
Met Ser Glu Thr Lys	
1 5	
CCT AAA TAT AAT TAC GTA AAO AAT AAA GAG CTT TTA CAA GCT ATT ATT	163
Pro Lys Tyr Asn Tyr Val Asn Asn Lys Glu Leu Leu Gln Ala Ile Ile	
10 15 20	
GAT TGG AAA ACA GAA TTA GCA AAT AAT AAA GAC CCA AAT AAA GTA GTT	211
Asp Trp Lys Thr Glu Leu Ala Asn Asn Lys Asp Pro Asn Lys Val Val	
25 30 35	
CGT CAG AAT GAT ACT ATC GGA TTA GCC ATT ATG CTT ATT CCA GAA GGC	259
Arg Gln Asn Asp Thr Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Ile Ala Glu Gly	
40 45 50	
TTA TCT AAA CGT TTC AAC TTT TCA GGA TAC ACC CAG TCT TGG AAA CAA	307
Leu Ser Lys Arg Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Thr Gln Ser Trp Lys Gln	
55 60 65	
GAA ATG ATT GCA GAT GGT ATA GAA GCT TCT ATT AAG GGG CTT CAC AAT	355
Glu Met Ile Ala Asp Gly Ile Glu Ala Ser Ile Lys Gly Leu His Asn	
70 75 80 85	
TTT GAT GAA ACG AAA TAT AAA AAC CCA CAT GCG TAT ATA ACT CAA GCT	403
Phe Asp Glu Thr Lys Tyr Lys Asn Pro His Ala Tyr Ile Thr Gln Ala	
90 95 100	

TGT TTT AAT GCA TTC GTC CAA CGT GGA TCC ATC GAT CCA CCA TCC GTA	451
Cys Phe Asn Ala Phe Val Gln Arg Gly Ser Ile Asp Pro Pro Ser Val	
105 110 115	
TCA GAA ATA CAA CTA ATG CAT AAT CTG GGT AAA CAT CTG AAT TCA ATG	499
Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met	
120 125 130	
GAA CGT GTA GAA TGG CTG CGT AAA AAA CTG CAG GAT GTA CAT AAT TTT	547
Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe	
135 140 145	
GTA GCT CTG GGT TAACTCGAGC AGATCCGGCT GCTAACAAG CCCGAAGGA	599
Val Ala Leu Gly	
150	
AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA CCGCTGAGCA ATAAGTAGCA TAACCCCTTG GGGCCCTTGG	659
GGCCTCTAAA CGGCTCTTCA CCGCTTTTGT GGTGAAGGA GGAAGTATAT CCGGATAA	717

图 2

AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCACAAC GGTTTCCCTC	60
TAGAAATAAT TTTGTTTAAC TTTAAGAAGC AGATATACAT ATG TCA GAA ACT AAG	115
Met Ser Glu Thr Lys	
1 5	
CCT AAA TAT AAT TAC GTA AAC AAT AAA GAG CTT TTA CAA GCT ATT ATT	163
Pro Lys Tyr Asn Tyr Val Asn Asn Lys Glu Leu Leu Gln Ala Ile Ile	
10 15 20	
GAT TGG AAA ACA GAA TTA GCA AAT AAT AAA GAC CCA AAT AAA GTA GTT	211
Asp Trp Lys Thr Glu Leu Ala Asn Asn Lys Asp Pro Asn Lys Val Val	
25 30 35	
CGT CAG AAT GAT ACT ATC GGA TTA GCC ATT ATG CTT ATT GCA GAA GGC	259
Arg Gln Asn Asp Thr Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Ile Ala Glu Gly	
40 45 50	
TTA TCT AAA CGT TTC AAC TTT TCA GGA TAC ACC CAG TCT TGG AAA CAA	307
Leu Ser Lys Arg Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Thr Gln Ser Trp Lys Gln	
55 60 65	
GAA ATG ATT GCA GAT GGT ATA GAA GCT TCT ATT AAG CGG CTT CAC AAT	355
Glu Met Ile Ala Asp Gly Ile Glu Ala Ser Ile Lys Gly Leu His Asn	
70 75 80 85	
TTT GAT GAA ACG AAA TAT AAA AAC CCA CAT GCG TAT ATA ACT CAA GCT	403
Phe Asp Glu Thr Lys Tyr Lys Asn Pro His Ala Tyr Ile Thr Gln Ala	
90 95 100	

TGT TTT AAT GCA TTC GTC CAA CGT ATT AAA AAA GAA CGT AAG GAA GTT	451
Cys Phe Asn Ala Phe Val Gln Arg Ile Lys Lys Glu Arg Lys Glu Val	
105 110 115	
GCA AAG AAA TAT AGT TAC TTC GTT CAC AAT GTC TAT GAC AGC CGT GAC	499
Ala Lys Lys Tyr Ser Tyr Phe Val His Asn Val Tyr Asp Ser Arg Asp	
120 125 130	
GAC GAT ATG GTT GCG TTA GTA GAT GAA ACT TTT ATT CAA GAC ATC TAT	547
Asp Asp Met Val Ala Leu Val Asp Glu Thr Phe Ile Gln Asp Ile Tyr	
135 140 145	
GAT AAA ATG ACG CAT TAC GAA GAA TCA ACC TAT ACA ACA CCG GGG GCT	595
Asp Lys Met Thr His Tyr Glu Glu Ser Thr Tyr Arg Thr Pro Gly Ala	
150 155 160 165	
GAA AAG AAA AGT GTT GTA GAT GAT TCT CCT AGT TTG GAT TTT TTA TAT	643
Glu Lys Lys Ser Val Val Asp Asp Ser Pro Ser Leu Asp Phe Leu Tyr	
170 175 180	
GAG GCT AAC GAT GGA TCC GTT AAC GGT CCA TCC GTA TCA GAA ATA CAA	691
Glu Ala Asn Asp Gly Ser Val Asn Gly Pro Ser Val Ser Glu Ile Gln	
185 190 195	
CTA ATG CAT AAT CTG GGT AAA CAT CTG AAT TCA ATG GAA CGT GTA GAA	739
Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu	
200 205 210	
TGG CTG CGT AAA AAA CTG CAG GAT GTA CAT AAT TTT GTA GCT CTG GGT	787
Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe Val Ala Leu Gly	
215 220 225	

TAACTCGAGC AGATCCGGCT CCTAACAAAG CCCGAAAGGA AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA 847

CCGCTGAGCA ATAACTAGCA TAACCCCTTG GGGCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA 907

GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAACATAT CCGGATAA 945

说明书附图

图 1

AGATCTCGAT CCCGCGAANT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCACAAC GGTTTCCCTC	60
TAGAAATAAT TTTGTTTAAC TTTAAGAAGG AGATATACAT ATG TCA GAA ACT AAG	115
Met Ser Glu Thr Lys	
1 5	
CCT AAA TAT AAT TAC GTA AAC AAT AAA GAG CTT TTA CAA GCT ATT ATT	163
Pro Lys Tyr Asn Tyr Val Asn Asn Lys Glu Leu Leu Gln Ala Ile Ile	
10 15 20	
GAT TGG AAA ACA GAA TTA GCA AAT AAT AAA GAC CCA AAT AAA GTA GTT	211
Asp Trp Lys Thr Glu Leu Ala Asn Asn Lys Asp Pro Asn Lys Val Val	
25 30 35	
CGT CAG AAT GAT ACT ATC GGA TTA GCC ATT ATG CTT ATT GCA GAA GGC	259
Arg Gln Asn Asp Thr Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Ile Ala Glu Gly	
40 45 50	
TTA TCT AAA CGT TTC AAC TTT TCA GGA TAC ACC CAG TCT TGG AAA CAA	307
Leu Ser Lys Arg Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Thr Gln Ser Trp Lys Gln	
55 60 65	
GAA ATG ATT GCA GAT GGT ATA GAA GCT TCT ATT AAG GGG CTT CAC AAT	355
Glu Met Ile Ala Asp Gly Ile Glu Ala Ser Ile Lys Gly Leu His Asn	
70 75 80 85	
TTT GAT GAA ACG AAA TAT AAA AAC CCA CAT GCG TAT ATA ACT CAA GCT	403
Phe Asp Glu Thr Lys Tyr Lys Asn Pro His Ala Tyr Ile Thr Gln Ala	
90 95 100	

【五】

1-1

451

499

547

599

659

717

图 2

AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCACAAC GGTTTCCCTC	60
TAGAAATAAT TTTGTTTAAC TTTAAGAAGG AGATATACAT ATG TCA GAA ACT AAG	115
Met Ser Glu Thr Lys	
1 5	
CCT AAA TAT AAT TAC GTA AAC AAT AAA GAG CTT TTA CAA GCT ATT ATT	163
Pro Lys Tyr Asn Tyr Val Asn Asn Lys Glu Leu Leu Gln Ala Ile Ile	
10 15 20	
GAT TGG AAA ACA GAA TTA GCA AAT AAT AAA GAC CCA AAT AAA GTA GTT	211
Asp Trp Lys Thr Glu Leu Ala Asn Asn Lys Asp Pro Asn Lys Val Val	
25 30 35	
CGT CAG AAT GAT ACT ATC GGA TTA GCC ATT ATG CTT ATT GCA GAA GGC	259
Arg Gln Asn Asp Thr Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Ile Ala Glu Gly	
40 45 50	
TTA TCT AAA CGT TTC AAC TTT TCA GGA TAC ACC CAG TCT TGG AAA CAA	307
Leu Ser Lys Arg Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Thr Gln Ser Trp Lys Gln	
55 60 65	
GAA ATG ATT GCA GAT GGT ATA GAA GCT TCT ATT AAG GGG CTT CAC AAT	355
Glu Met Ile Ala Asp Gly Ile Glu Ala Ser Ile Lys Gly Leu His Asn	
70 75 80 85	
TTT GAT GAA ACG AAA TAT AAA AAC CCA CAT GCG TAT ATA ACT CAA GCT	403
Phe Asp Glu Thr Lys Tyr Lys Asn Pro His Ala Tyr Ile Thr Gln Ala	
90 95 100	

图 2-1

TGT TTT AAT GCA TTC GTC CAA CGT ATT AAA AAA GAA CGT AAG GAA GTT	451
Cys Phe Asn Ala Phe Val Gln Arg Ile Lys Lys Glu Arg Lys Glu Val	
105 110 115	
GCA AAG AAA TAT AGT TAC TTC GTT CAC AAT GTC TAT GAC AGC CGT GAC	499
Ala Lys Lys Tyr Ser Tyr Phe Val His Asn Val Tyr Asp Ser Arg Asp	
120 125 130	
GAC GAT ATG GTT GCG TTA GTA GAT GAA ACT TTT ATT CAA GAC ATC TAT	547
Asp Asp Met Val Ala Leu Val Asp Glu Thr Phe Ile Gln Asp Ile Tyr	
135 140 145	
GAT AAA ATG ACG CAT TAC GAA GAA TCA ACC TAT AGA ACA CCG GGG GCT	595
Asp Lys Met Thr His Tyr Glu Glu Ser Thr Tyr Arg Thr Pro Gly Ala	
150 155 160 165	
GAA AAG AAA AGT GTT GTA GAT GAT TCT CCT AGT TTG GAT TTT TTA TAT	643
Glu Lys Lys Ser Val Val Asp Asp Ser Pro Ser Leu Asp Phe Leu Tyr	
170 175 180	
GAG GCT AAC GAT GGA TCC GTT AAC GGT CCA TCC GTA TCA GAA ATA CAA	691
Glu Ala Asn Asp Gly Ser Val Asn Gly Pro Ser Val Ser Glu Ile Gln	
185 190 195	
CTA ATG CAT AAT CTG GGT AAA CAT CTG AAT TCA ATG GAA CGT GTA GAA	739
Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu	
200 205 210	
TGG CTG CGT AAA AAA CTG CAG GAT GTA CAT AAT TTT GTA GCT CTG GGT	787
Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe Val Ala Leu Gly	
215 220 225	

2-2

TAACTCGAGC AGATCCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAGGA AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA	847
CCGCTGAGCA ATAAC TAGCA TAACCCCTTG GGGCCCTTG GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA	907
GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAAC TATAT CCGGATAA	945