



H U 0 0 0 2 2 6 8 6 6 B 1

(19) **HU****MAGYAR KÖZTÁRSASÁG**
Magyar Szabadalmi Hivatal(11) Lajstromszám: **226 866**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 04560**(22) A bejelentés napja: **1998. 09. 02.**(40) A közzététel napja: **2001. 04. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértékesítőben: **2009. 12. 28.**(51) Int. Cl.: **A61K 38/29** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/EP 98/05550(87) A nemzetközi közzétételi szám: **WO 9912561**

(30) Elsőbbségi adatok:

60/058,324 1997. 09. 09. US

(72) Feltaláló:

Vickery, Brian Henry,
Los Altos Hills, Kalifornia (US)

(73) Jogosult:

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, Basel (CH)

(74) Képviselő:

dr. Tóth-Urbán László és dr. Jalsovszky
Györgyné ügyvédek, Budapest

(54)

Törést gyógyító PTHrP analógok

(57) Kivonat

A találmány tárgya paratiroid hormonnal rokon peptid (PTHrP) olyan polipeptidanalógjainak és ezek sóinak felhasználása csontgyógyításra és törés-helyreállításra szolgáló gyógyászati készítmények előállítására, ahol az analóg egy 30–50 aminosavmaradékot tartalmazó N-terminális rövidített szekvencia, amely-

ben a PTHrP analóg 22–31 aminosavmaradéka amfipatikus alfa-hélixet képez, és az amfipatikus alfa-hélix a

Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu
képletnek felel meg – a képletben Xaa pozitív töltést hordozó aminosavmaradékot jelent.

HU 226 866 B1

Az aktában kiegészítő műszaki információ található.

A leírás terjedelme 18 oldal (ezen belül 6 lap ábra)

Az Amerikai Egyesült Államokban évente hozzávetőlegesen 8–10 millió csonttörést jelentenek, és ezek közül több mint 1 millió kórházi ápolást igényel. A csonttörések kezelésének éves becsült költsége több mint 20 milliárd dollár. Ez az összeg már önmagában jelentős, és a lakosság életkorának általános emelkedésével várhatóan növekedni fog. Bár az öregedéssel összefüggő csontvesztések megelőzésére számos gyógykezelés ismert, a már bekövetkezett csonttörések kezelésére kevesebb eljárás áll rendelkezésre. Ezek többsége helyi gyógykezelést igényel, amely a szállítási nehézségek miatt és a gyenge beteg-egységműködés következtében hátrányos. A csontgyógyulás és törés-helyreállítás megkönnyítésére további módszerekre van szükség.

Az irodalomban nemrégben arról számoltak be, hogy parathyroid hormonnal (PTH) végzett időszakos kezelés ovariectomizált patkányon a töréses gyógyulást javítja, és ez azt jelzi, hogy a PTH-kezelés klimax utáni osteoporotikus törések kezelésénél potenciálisan hasznos lehet [H. W. Kim et al.; Transactions of the, 43rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 22. kötet, 1. szekció, 18–31. Abstract, február 9–13 (1997); H. W. Kim et al.; Journal of Bone and Mineral Research, 11. kötet, 1. kiegészítés, 152. oldal, 248. oldal, augusztus (1996)]. Más kutatók arról számolnak be, hogy a morfo-

genetikus fehérje-4-et és/vagy a PTH egyik fragmensét (1–34 aminosav) kifejező génaktivált mátrixnak szegmentált csonttöréshiányos patkánymodellbe történő beültetése új csontképződést idéz elő, amely a csonthiányt a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva gyorsabban hidalja át [Jianming Fang et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), Vol. 93; 5753–5758, június (1996)]. Az irodalom szerint különböző PTH-analógok osteoporosis kezelésére alkalmazhatók (5 556 940 és 5 559 792 sz. USA szabadalmi leírás). A törésgyógyítás további módszerei közé tartozik a humán vételemezkefaktor 4 (5 622 935 sz. USA szabadalom), benzo-tiofének (5 502 074 sz. USA szabadalom) és 24,25-dihidroxi-D₃-vitamin (5 069 905 sz. USA szabadalom) alkalmazása.

A korábban rosszindulatú humorális hiperkalcémiáért felelős faktorként ismert PTH-rokon-peptid (PTHrP) egy, a PTH/PTHrP receptorhoz kötődő, 138–174 aminosavból álló peptid (alternatív hasítástól függően). A PTHrP N-terminális 34 aminosavszekvenciája a PTH-hoz korlátozott szekvenciahomológiát mutat, bizonyos esetekben azonban a PTH-hoz hasonló aktivitással rendelkezik. A PTHrP azonban a PTH-hoz viszonyítva általában kevésbé hatékony, gyengébb csontanabolizáló hatást fejt ki és a törésgyógyítással nem hozták összefüggésbe.

A hPTHrP (1–34) szekvenciája a következő:

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

Ile His Thr Ala (SEQ ID NO:1).

A PTHrP számos rövidített homológját és analógját leírták. Az irodalom szerint osteoporosis kezelésére alkalmazhatók az olyan analógok, amelyekben a PTHrP (1–34) 22–31 aminosavmaradékának helyén amfipatikus alfa-hélix van jelen (5 589 452 sz. USA szabadalmi leírás és WO 97/07815 sz. nemzetközi közrebecsítási irat) és rokon származékai [B. H. Vickery et al., J. Bone & Mineral Research, 11(12): 1943–1951 (1996); D. Leaffer et al. Endocrinology, 136(8):3624–3631 (1995)]. Osteoporosis kezelésére használható további PTHrP analógokat ismertet a WO 95/02610, WO 94/01460, WO 96/40775 és WO 98/30590 sz. nemzetközi közzétételi irat. A PTHrP (1–34) és PTHrP (7–34) monociklikus és biciklikus analógjai a PTH receptorhoz erősen kötődnek és osteoblastszerű sejtekben a PTH által serkentett adenil-cikláz-aktivitást serkentik (vagy antagonizálják) [Michael Chorev et al. Biochemistry, 36:3293–3299 (1997), és WO 96/40193 sz. nemzetközi közrebecsítási irat].

A találmány tárgyát képezi a paratiroid hormonnal rokon peptid (PTHrP) olyan polipeptidanalógjainak és ezek sóinak felhasználása csontgyógyításra és törés-helyreállításra szolgáló gyógyászati készítmények előállítására, ahol az analóg egy 30–50 aminosavmaradék-

ot tartalmazó N-terminális rövidített szekvencia, amelyben a PTHrP analóg 22–31 aminosavmaradéka amfipatikus alfa-hélixet képez, és az amfipatikus alfa-hélix a

Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu
képletnek felel meg – a képletben Xaa pozitív töltést hordozó aminosavmaradékot jelent.

A fenti amfipatikus hélix előnyös kiviteli alakjainak a PTHrP szekvenciába – különösen a humán PTHrP N-terminális rövidített szekvenciájába (1–38 aminosavból az 1–32 maradék) – történő beillesztésekor kapott polipeptidok csontgyógyulásnál és törés-helyreállításnál hatékonyak. A gyógyászati készítményt előnyösen szisztémásan adagoljuk.

Az ábrák rövid ismertetése

Az 1. ábrán patkány csonttörés modellben a szegmentált csonthiány hetenkénti radiográfiai sűrűségét mutatjuk be. A kezelést a PTHrP B vagy C analógjával 5 héten át végezzük és az eredményeket a szintén 5 hétig kezelt kontrollal hasonlítjuk össze. Az eredményekből látható, hogy 4 hét után a PTHrP analógokkal kezelt állatok csontnövekedése a

kontrollnál nagyobb. PTHrP B és C analóg=(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹Ala¹⁹hPTHrP(1-34)NH₂, illetve

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹His²⁶hPTHrP(1-34)NH₂.

A 2. ábrán a szegmentált csont és az ellenoldali combcsont (kontroll) radiográfiai sűrűségarányát mutatjuk be szegmentált csonttöréshiány patkánymodellben. Az eredményeket a kontrollal vagy PTHrP B vagy C analóggal végzett 6 hetes kezelés után tüntetjük fel. A PTHrP B és C analóggal kezelt patkányok a kontrollállatokhoz viszonyítva nagyobb csontsűrűséget mutatnak.

A 3. ábrán csonthiány nagy feloldású radiográfiát tüntetjük fel, szegmentált patkány csonttöréshiány modellben, a kontrollal (3A) vagy PTHrP C analóggal (3B) végzett 6 hetes kezelés után. A radiográfokból látható, hogy míg a kontrollcsonthiány nem forrt össze, addig a PTHrP C analóggal kezelt csonthiány meggyógyult.

A 4A. és 4B. ábrán nyúl membránon belüli csonthiányának gyógyulását mutatjuk be, a PTHrP D analóg (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP(1-34)NH₂ két különböző dóziséval végzett kezelés után.

Az 5. ábrán kortikoszteroid által késleltetett csonttörésmo­ dellben a gyógyulás mértékét tüntetjük fel, PTHrP D analóggal, (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP(1-34)NH₂ történő kezelés után.

Találmányunk további részleteit az alábbiakban ismertetjük.

A különböző szokásos nukleotidbázisok és aminosavak egybetűs és hárombetűs rövidítéseit az alábbi irodalmi helyen közölt ajánlás szerint alkalmazzuk: [Pure Appl. Chem. 31:639-645 (1972) és 40:277-290 (1974)]. A rövidítések L-aminosavakra vonatkoznak, feltéve, hogy mást nem közlünk (D- vagy D,L-aminosavak). Bizonyos, a természetben előforduló vagy elő nem forduló savak akirálisak (pl. glicin). Valamennyi peptidszekvenciát oly módon ábrázolunk, hogy az N-terminális aminosav a bal oldalon és a C-terminális aminosav a jobb oldalon helyezkedik el.

A találmány szerint felhasznált PTHrP analógokban a természetben előforduló és a természetben elő nem forduló aminosavak egyaránt szerepelhetnek. A természetben elő nem forduló aminosavak közül pl. az alábbiakat említjük meg (rövidítéseikkel együtt): homoszerin (hSer), homoszerin-lakton (hSerlac), homocisztein (Hcy), homoarginin (hArg), homocitrullin (Hci), penicillamin (Pen), Na-metil-arginin (N-MeArg), norleucin (Nle), norvalin (Nval), norizoleucin (Nile), N-metil-izoleucin (N-Melle), fenil-glicin (PhG), t-butil-glicin (Tle), hidroxi-prolin (Hyp), 3,4-dehidroprolin (Δ-Pro), piroglutaminn (Pyr,Glp), ornitin (Orn), 1-amino-izovajsav (1-Aib), 2-amino-izovajsav (2-Aib), 2-amino-vajsav (2-Abu), 4-amino-vajsav (4-Abu), 2,4-diamino-vajsav (A2bu), α-amino-szuberénsav (Asu), albizzin (Abz), β-ciklohexil-alanin (Cha), 3-(1-naftil)-alanin (1-Nal), 3-(2-naftil)-alanin (2-Nal), citrullin (Cit), pipekolinsav

(Pip), 4-klór-fenil-alanin (4-ClPhe), 4-fluor-fenil-alanin (4-Fphe), szarkozin (Sar) és 1-amino-propánkarbonsav (1-NCPC). A természetben előforduló és elő nem forduló aminosavak a kereskedelem­ ben egyaránt beszerezhetők. Néhány forgalmazó: NovaBiochem (San Diego, CA, USA) és Bachem (Torrance, CA, USA).

A PTHrP polipeptidanalógokat a hPTHrP natív szekvenciájától való eltérésekre hivatkozva írjuk le. A (MAP₁₋₁₀) jelölés az alábbi amfipatikus spirális szekvenciára vonatkozik:

Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu
(SEQ ID NO:2)

(azaz a MAP-szekvencia 10 aminosavmaradékból áll).

Ennek megfelelően a (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP(1-34) jelölésű szekvencia a hPTHrP olyan 1-34 N-terminális maradékára vonatkozik, amelyben a 22-31 maradék közötti szegmenst a MAP-szekvencia helyettesíti. A MAP-szekvencián belül további változatok lehetségesek. Így az (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹His²⁶hPTHrP(1-34) jelölés a hPTHrP olyan 1-34 N-terminális maradékára vonatkozik, amelyben a 22-31 maradék közötti szegmenst egy olyan MAP-szekvencia helyettesíti, amelynek a 26-helyzetében hisztidin van jelen (a standard MAP-szekvenciában lizin szerepel).

Hasonlóképpen jelöljük a természetben előforduló szekvencia további variánsait. Az (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹Pro³²hPTHrP(1-32) a hPTHrP 1-32 N-terminális maradékára vonatkozik, amely a 22-31-helyzetben MAP-szekvenciát és a 32-helyzetben prolint tartalmaz (a természetben előforduló hisztidin helyén). Az (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹D-Orn³⁴laktám-hPTHrP(1-34) jelölés a hPTHrP olyan 1-34 N-terminális maradékára vonatkozik, amely a 22-31-helyzetben MAP-szekvenciát és a 34-helyzetben ornitint tartalmaz, mimellett az ornitinoldallánc aminocsoportja és a karboxilvégcsoport között laktám alakul ki. Az (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hSer³⁴hPTHrP(1-34)Thr His Ile Gln NH₂ jelölés a hPTHrP olyan 1-34 N-terminális maradékára vonatkozik, amely a 22-31-helyzetben MAP-szekvenciát, a 34-helyzetben homoszerint, a 35-38-helyzetben további Thr His Ile Gln szekvenciát tartalmaz, és a karboxilvégcsoport egy primer amid.

Az aminosavmaradékok között ciklizált kötések­et tartalmazó polipeptideket oly módon jelöljük, hogy a kapcsolódó maradékokat zárójelbe tesszük és eléjük „c” betűt írunk. A két maradék közötti kötések általában az oldalláncok funkciós csoportjai között alakulnak ki és tipikusan amid- vagy észterkötések. Így az (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹c[Lys¹³, Asp¹⁷]hPTHrP(1-34)hSer³⁴ lakton a hPTHrP olyan 1-34 N-terminális maradékára vonatkozik, amelyben a 22-31 maradék közötti szegmenst a MAP-szekvencia helyettesíti, a 13-helyzetű lizin aminooldallánca a 17-helyzetű aszpartát karboxiloldallancával zár gyűrűt, és a 34-helyzetben további homoszerin van jelen, amelyben a homoszerin hidroxiloldallánca és a karboxilvégcsoport között lakton képződik. Hasonlóképpen az (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹c[Lys¹³, Asp¹⁷]hPTHrP (1-34) jelölés a hPTHrP olyan 1-34 N-terminális maradékára vonatkozik, amelyben a 22-31 maradék közötti szegmenst a

MAP-szekvencia helyettesíti, és a 13-helyzetű lizin aminosavaként a 17-helyzetű aszpartát karboxiloldalláncával gyűrűt zár.

A „hidrofil aminosav (Haa)” kifejezés olyan aminosavakra vonatkozik, amelyek a peptidkötés kialakításához szükségeseken kívül legalább egy hidrofil funkcionális csoportot tartalmaznak (pl. arginin, aszparagin, aszparaginsav, glutaminsav, glutamin, hisztidin, lizin, szerin, treonin és homológjaik).

A „lipofil aminosav (Laa)” kifejezés töltés nélküli, alifás vagy aromás aminosavakra vonatkozik (pl. izoleucin, leucin, metionin, fenil-alanin, triptofán, tirozin, valin és homológjaik).

A jelen találmány értelmében az alanin „amfil” vegyületnek minősül, azaz hidrofil és lipofil vegyületnek egyaránt tekinthető.

A „PTHrP-vel analóg polipeptid” kifejezésen a PTHrP-hez viszonyítva a szakirodalomban elfogadott helyettesítéseket, törléseket vagy beillesztéseket tartalmazó polipeptidek, vagy a PTHrP-vel lényegében homológ polipeptidek értendők, amelyek a PTHrP-hez hasonló fiziológiai aktivitással rendelkeznek.

A „PTHrP gyógyászati aktív rövidített analógjai” kifejezés a PTHrP teljes szekvenciájánál kevesebb aminosavat tartalmazó, azonban hasonló gyógyászati hatással rendelkező polipeptidekre vonatkozik. Hasonló gyógyászati hatás kifejtéséhez a rövidített PTHrP analógnak a PTHrP-vel nem kell teljesen homológnak lennie. A rövidített analógok általában a C-terminuson vannak lerövidítve és 30–40 maradékot tartalmaznak, előnyösen PTHrP(1–32), PTHrP(1–34) és PTHrP(1–38).

Ezek a rövidített analógok előnyös képviselői, e vegyületcsoport azonban nincs ezekre a származékokra korlátozva. Az analógok általában az aminosavak szokásos helyettesítőit tartalmazzák.

A polipeptidekkel kapcsolatban használt „lényegében homológ” kifejezés azt jelenti, hogy a szóban forgó polipeptid a hivatkozott polipeptiddel legalább kb. 80%-ban, általában legalább 90%-ban és előnyösen 95%-ban homológ. A peptidok homológiáját általában szekvenciaanalízis-szoftver felhasználásával mérjük (Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705 USA).

Az „amfipatikus alfa-hélix” kifejezés bizonyos polipeptidek által kialakított olyan szekunder szerkezetre vonatkozik, amelyekben az aminosavak alfa-spirális konfigurációjúak és a csavaronal hossz tengelye mentén szembenálló poláros és nem poláros részeket tartalmaznak. Az amfipatikus spirális szekvenciák megtervezése a szakember tudásához tartozik. A találmány szerinti eljárásnál felhasználható előnyös amfipatikus spirális szekvenciák pl. az 5 589 452 sz. amerikai szabadalmi leírásban vagy a WO 97/07815 sz. nemzetközi közrebocsátási iratban kerültek ismertetésre.

Találmányunk alapja az a felismerés, hogy a 22–31-helyzetben amfipatikus alfa-hélixet tartalmazó bizonyos PTHrP analógok csontgyógyításnál és törés-helyreállításnál hatékonyak. Az amfipatikus alfa-hélix hidrofil

aminosavakat (Haa) és lipofil aminosavakat (Laa) tartalmaz a Haa (Laa Laa Haa Laa)₂ Laa szekvenciában elrendezve; közelebről az amfipatikus alfa-hélix a

Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu

képletnek felel meg – a képletben Xaa pozitív töltést hordozó aminosavmaradékot jelent.

A fenti amfipatikus hélixnek a PTHrP-szekvenciába – különösen a humán PTHrP N-terminális rövidített szekvenciájába (az 1–38 maradékból az 1–32 maradék) – történő beillesztésekor nyert polipeptidek csontgyógyításnál és törés-helyreállításnál hatékonyak. A PTH-vel, valamint a fenti amfipatikus spirális szegmenst nem tartalmazó PTHrP-vel vagy analógjaival (mint amelyeket például a WO 95/11697, WO 97/02834, WO 94/02510 és WO 96/40193 sz. nemzetközi közzétételi irat ismerteti) ellentétben a találmány szerint felhasznált analógok hiperkalcémiát nem okoznak. Ezenkívül a találmány szerinti analógok a csontgyarapodást jobban segítik elő, mint a PTH vagy a PTHrP.

Megjegyezzük, hogy a 22–31-helyzetű amfipatikus hélix beiktatása mellett a PTHrP szekvenciájában az említett tartományon kívül a helyettesítések, törlések és beillesztések széles skálája elvégezhető, a polipeptid háromdimenziós szerkezetének megőrzése mellett. A PTH és PTHrP szekvenciájának a kapott analógok fiziológiai aktivitását megőrző változtatásai pl. az alábbi irodalmi helyeken kerültek ismertetésre: 5 599 792, 5 556 940, 5 607 915 és 5 589 452 sz. amerikai szabadalmi leírás és WO 91/06564, WO 94/02510, WO 95/11697, WO 96/40193 és WO 97/07815 sz. nemzetközi közrebocsátási irat. A szakember számára várható, hogy az irodalomban elfogadott fehérjeszerkezet modellező módszerek segítségével a fiziológiai aktivitást megtartó további variánsok állíthatók elő. A variánsok előállítására felhasználható módszerek közül többek között az alábbi irodalmi helyeken leírtakat említjük meg: I. Ladunga és R. F. Smith, Protein Eng., 3:187–196 (1997) és M. J. Thompson és R. A. Goldstein, Proteins, 1:28–37 (1996).

Találmányunk értelmében olyan helyettesítéssel variánsokat alkalmazhatunk, amelyeknél a natív szekvencia legalább egy aminosavat eltávolítunk és helyette ugyanerre a helyre egy másik aminosavat helyezünk. A helyettesítés egyszeres vagy többszörös lehet, amikor is ugyanabban a molekulában csak egy aminosavat, illetve két vagy több aminosavat helyettesítünk és általában a szokásos helyettesítések végezhetők el. Így egy hidrofil aminosavnak egy másik hidrofil aminosavra, vagy egy hidrofób aminosavnak egy másik hidrofób aminosavra történő lecserélése esetén képezett variáns várhatóan a prekursor törés-gyógyító tulajdonságaihoz hasonló hatással rendelkezik. A helyettesítések közé tartoznak az olyan PTHrP analógok, amelyekben a C-terminális maradék amid formájában van jelen. További helyettesítések töltéssel rendelkező vagy töltést nem tartalmazó aminosavakon egyaránt elvégezhetők. A fenti csoportok a helyettesítések megkönnyítése céljából alcsoportokba sorolhatók.

Töltéssel rendelkező aminosavak:

savas maradékok: aszparaginsav, glutaminsav, 2-amino-szuberénsav;
bázikus maradékok: lizin, arginin, hisztidin, ornitin.

Töltéssel nem rendelkező aminosavak:

hidrofil maradékok: szerin, treonin, aszparagin, glutamin, metionin; alifás maradékok: glicin, alanin, valin, leucin, norleucin, izoleucin;
nem poláros maradékok: cisztein, homocisztein, metionin, prolin;
aromás maradékok: fenil-alanin, tirozin, triptofán, hisztidin.

Alternatív módon az aminosavhelyettesítések a bioizosztéria elvén alapulhatnak. A bioizosztér helyettesítések általában minimumra csökkentik a véletlenszerű helyettesítések károsító komformációs hatásait. Az „alanin scanning” módszert használhatjuk azon helyzetek azonosítására, amelyeken az izosztér helyettesítés a fiziológiai aktivitást megtartó variánsok keletkezése mellett elvégezhető, lásd pl. [K. H. Pearce Jr., M. H. Ultsch, R. F. Kelley, A. M. de Vos és J. A. Wells, *Biochemistry*, 35(32): 10 300–10 307 (1996); és B. Li, J. Y. Tom, D. Oare, R. Yen, w. J. Fairbrother, J. A. Wells és B. C. Cunningham, *Science*, 270, 1657–1660 (1995)].

Az izosztér aminosavak előnyös képviselőit az alábbi táblázatban tüntetjük fel.

Aminosav	Izosztér aminosav
Ala	Ser, Gly
Glu	Gln, Asp
Gln	Asn, Glu
Asp	Asn, Glu
Asn	Ala, Asp
Leu	Met, Ile
Gly	Pro, Ala
Lys	Met, Arg
Ser	Thr, Ala
Val	Ile, Thr
Arg	Lys, Met, Asn
Thr	Ser, Val
Pro	Gly
Ile	Met, Leu, Val
Met	Ile, Leu
Phe	Tyr
Tyr	Phe
Cys	Ser, Ala
Trp	Phe
His	Asn, Gln

A törléses variánsokat oly módon állítjuk elő, hogy a natív aminosavszekvencia egy vagy több aminosavát

eltávolítjuk. Ennek során a molekula bizonyos tartományában általában egy vagy két aminosavat törünk. A törléseket általában a szekvencia egyik végén – különösen a karboxilvégcsoporton – végezzük el. Előnyösek a PTHrP (1–34) fragmensek, azonban a karboxilvégcsoporton tovább rövidített szekvenciák is előnyös csontgyógyító hatással rendelkeznek.

A beillesztéses vagy addíciós variánsokat oly módon képezzük, hogy a natív szekvencia meghatározott helyzetében az egyik aminosav közvetlen szomszédságába valamely aminosavat illesztünk be. Az „egyik aminosav közvetlen szomszédságába” kifejezés azt jelenti, hogy az aminosav alfa-karboxil- vagy alfa-amino-csoportjához kapcsolódik. Az addíciós vagy beillesztéses variánsokat általában szintén a szekvencia valamelyik végén képezzük, előnyösen a karboxilvégcsoporton.

A natív szekvencia fent említett módosításai közül a helyettesítések és a karboxilvégcsoporton végrehajtott addíciók és törlések előnyösek.

A jelen találmány értelmében törésgyógyításra szolgáló gyógyszerkészítmények gyártására felhasználható polipeptid PTHrP analógok egy részét általánosságban ismerteti az 5 589 452 sz. USA szabadalom és a WO 97/07815 sz. nemzetközi közrebocsátási irat. További analóggént az N-terminális hPTHrP(1–32), hPTHrP(1–34) és hPTHrP(1–38) gyűrűs analógjai említhetők meg, amelyek a 22–31-helyzet között MAP-szekvenciát tartalmaznak és adott esetben a 13- és 17-és/vagy 26- és 30-helyzetben oldallánc funkciók csoportjaikon keresztül kapcsolódó maradékokat tartalmaznak. A szakember által belátható, hogy a 13- és 17-helyzetben többfajta helyettesítés eszközölhető, amely az említett két helyzet közötti gyűrűzárást lehetővé teszi.

Találmányunk szerint bármely emlősfaj (pl. ember, szarvasmarha, sertés vagy nyúl) PTHrP analógja felhasználható, előnyösen humán PTHrP alkalmazható. A fent említett előnyös kiviteli alakoknak az irodalomban elfogadott elvek szerint készített helyettesítéssel, törléssel és beillesztéssel variánsai szintén találmányunk tárgyát képezik.

Miként már közöltük, a találmány szerint felhasznált PTHrP analógokban a 22–31 aminosavmaradék által alkotott amfipatikus alfa-hélix a

Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu képletnek felel meg – a képletben Xaa pozitív töltést hordozó aminosavmaradékot jelent. Ez az amfipatikus alfa-hélix megfelelhet a korábban ismertetett MAP-szekvenciának, ahol a 26-helyzetben pozitív töltést hordozó aminosavmaradékként lizin van jelen, de a 26-helyzetben más pozitív töltésű aminosav (például hisztidin) maradékát is tartalmazhatja.

Találmányunk előnyös kiviteli alakját képezi az alábbi osztályokba tartozó vegyületek felhasználása:

(MAP_{1–10})^{22–31}hPTHrP-(1–34)NH₂
Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID NO:3) és

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹His²⁶hPTHrP(1-34)NH₂

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu His Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID NO:4).

Találmányunk másik előnyös kiviteli alakja szerint olyan hPTHrP(1-34) analógokat alkalmazunk, amelyek a 22-31-helyzetben MAP-szekvenciát, és ezenkívül az aminosavmaradékok (különösen a 13- és 17-, vagy 26- és 30-helyzetű maradékok) oldalláncában levő funkcionális csoportok között lejátszódó gyűrűzárás által képezett mono- vagy biciklikus alszerkezeteket tartalmaznak. Az oldallánc funkcionális csoportjai általában aminos-, hidroxil- vagy karboxilcsoportok és a gyűrűzárás amid- vagy észterkötés képződésén keresztül játszódik le. Az oldalláncban funkcionális aminocsoportot tartalmazó maradékok közül a lizint és az ornitint, míg az oldalláncban funkcionális karboxilcsoportot tartalmazó maradékok közül az aszparaginsavat és glutaminsavat említjük meg.

Az említett vegyületosztály előnyös képviselői az alábbi származékok:

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹[Lys¹³,Asp¹⁷]hPTHrP(1-34) hSer³⁴ lakton

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr hSerlac (SEQ ID NO: 5) és

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹[Lys¹³,Asp¹⁷]hPTHrP(1-34)NH₂,

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID NO: 6).

Találmányunk szerint előnyösen használható további hPTHrP analógok a 30-50 maradék közötti, előnyösen az 1-32, 1-33, 1-34, 1-35, 1-36, 1-37, és 1-38 N-terminális szekvenciák, amelyek a 22-31 maradékon MAP-szekvenciát tartalmaznak és adott esetben az 5-, 13-, 17-, 19-, 26-, 30-, 32- vagy 34-helyzetben egy vagy több helyettesítést hordoznak.

E vegyületosztály előnyös képviselői az alábbi származékok:

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹Ile⁵hPTHrP(1-34)NH₂

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID NO: 7),

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹Ala¹⁹hPTHrP(1-34)NH₂

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Ala Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID NO: 8),

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹Pro³²hPTHrP(1-34)NH₂

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Ala Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu Pro NH₂ (SEQ ID NO: 9),

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹D-Orn³⁴laktám hPTHrP (1-34)

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr D-Orn laktám (SEQ ID NO: 10),

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP (1-34) A2bu³⁴laktám

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr A2bu laktám (SEQ ID NO: 11) és

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hSer³⁴PTHrP(1-34)THIQ NH₂

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr hSer Thr His Ile Gln NH₂ (SEQ ID NO 12).

A találmány szerinti célra általában minden olyan polipeptid felhasználható, amely a korábbiakban ismertetett specifikus kiviteli alakokkal lényegében homológ. A találmány szerint felhasznált polipeptidek a leírt specifikus kiviteli alakokkal általában legalább kb. 50%-ban, előnyösen több mint kb. 80%-ban, különösen előnyösen több mint kb. 90%-ban és legelőnyösebben legalább kb. 95%-ban homológok. A homológia szempontjából összehasonlított polipeptidszekvencia hossza általában legalább kb. 20 aminosav, előnyösen legalább kb. 24 maradék, különösen legalább kb. 30 maradék és különösen előnyösen 32-40 maradék.

A találmány szerinti célra felhasznált vegyületeket az 5 589 452 sz. USA szabadalmi leírásban, valamint a WO 96/40193 és WO 97/07815 sz. nemzetközi közrebocsátási iratban leírt módszerekkel állíthatjuk elő. A vegyületeket általában szilárd fázisú szintézissel, oldatban végzett szintézissel vagy rekombináns módszerekkel állíthatjuk elő, amelynek során a kívánt polipeptidet kódoló gént kifejezzük és klónozzuk. Valamennyi fenti módszer a szakember által ismert. A szilárd fázisú szintéziseket előnyösen 40 vagy kevesebb aminosavat tartalmazó rövidített PTHrP analógok előállítására alkalmazhatjuk. A gyűrűs oldalláncokat tartalmazó analógokat előnyösen oly módon állítjuk elő, hogy a teljes védett polipeptidet a gyantán kialakítjuk, a védőcsoportokat eltávolítjuk és közvetlenül a polipeptidnek a gyantától való elválasztása előtt megfelelő kapcsolószerrel gyűrűzárást végzünk.

Kapcsolószerként pl. benzo-triazol-1-il-oxi-trisz(pirolidino)-foszfonium-hexafluoro-foszfát (PyBOP) alkalmazható.

A korábban meghatározott paratiroid hormonnal rokon peptid (PTHrP) polipeptidanalógok találmány szerinti felhasználásával készített gyógyszerek csonttörések és osteotómia gyógyítására alkalmazhatók, és pedig összeforrt és nem összeforrt törések esetében egyaránt. A gyógyszerekkel traumatikus és osteoporotikus törések egyaránt kezelhetők, például a csípő, combnyak, csukló, csigolyák, gerincoszlop, bordák, szegycsont, gége, légcső, orsócsont/singcsont, sípcsont, térdkalács, kulcsont, medence, felkarcsont, alsó láb, ujjak és lábujjak, arccsont és boka törései. A gyógysze-

rek az ízületek csatlakozásának (például a gerincoszlop, boka és láb, könyök, csípő csatlakozásának) is szolgálhatnak, és csípő, térd és váll arthredózisában is használhatók. A PTHrP analógok találmány szerinti felhasználásával készített gyógyszerek továbbá a csípő, térd, váll/könyök stb. arthroplastikus eljárásaival (beleértve a revíziós arthroplastikát) kapcsolatban is alkalmazható. A csontgyógyulás egyéb sebészeti beavatkozásokkal kapcsolatban is gyorsítható, pl. koponya- és felső állcsonti sebészet, fogsebészet és bűtyökeltávolítás esetében. A PTHrP analógok a porcszerű hegképződésen keresztül lejátszódó endochondrális csontgyógyulást (1. és 2. példa), valamint a közbelső hegképződést nem igénylő membránon belüli csontgyógyulást (3. példa) egyaránt gyorsítják. A membránon belüli csontgyógyulás különösen olyan esetekben hasznos, amikor a törés gyógyulását különböző tényezők késleltetik, pl. diabéteszes betegek, dohányosok, idős betegek, anémiás betegek, valamint kortikoszteroid (különösen krónikus glükokortikoid), krónikus NSAID vagy immunosuppresszív gyógyszerelésnek alávetett betegek esetében.

A PTHrP analógok törésgyógyítás megkönnyítésre felhasznált dózisa a kezelt állapot súlyosságától, az adagolás módjától és számos más ezekkel kapcsolatos tényezőtől függ. Az adott dózist fentiek alapján a kezelőorvos állapítja meg. A napi dózis általában kb. 0,01–10 µg/kg, előnyösen kb. 0,1–0,5 µg/kg testtömeg. Egy 50 kg-os beteg kezelésére felhasználandó napi hatóanyag dózis kb. 0,5–100 µg, előnyösen kb. 5–10 µg. A fenti hatóanyag dózist szokásos gyógyszerkészítmények formájában napi egy vagy több részletben, vagy szabályozott hatóanyag-leadású gyógyszerkészítmény felhasználásával adagolhatjuk, mindenkor az adott eset követelményeinek figyelembevételével. Az adagolást a gyógyászati szükségleteknek megfelelő időtartamon át végezzük, amely a sérülés súlyosságától függően néhány hét és néhány hónap között változik.

A PTHrP analógokat – a törések kezelésére jelenleg használatos legtöbb eljárással ellentétben – szisztémásan adagolhatjuk. A gyógyászati készítmény adagolása orálisan, parenterálisan (pl. szubkutáns, intramuszkuláris vagy intravénás úton), rektálisan, bukkálisan (pl. szublingválisan) transzdermálisan, pulmonárisan és intranazálisan történhet. A tüdőn keresztül és belélegeztetéssel elvégezhető adagolást biztosító rendszerek pl. az 5 607 915 sz. USA szabadalmi leírásban kerültek ismertetésre. A PTHrP analógok nazális adagolását a WO 97/07815 sz. nemzetközi közrebecsátási iratban írták le.

A PTHrP analógok találmány szerinti felhasználásával készített gyógyszerek olyan szisztémásan adagolandó készítmények is lehetnek, amelyeket egy második csontgyógyító szer helyi alkalmazásával kombinálva kell a szervezetbe juttatni.

A helyi úton alkalmazható csontgyógyító hatóanyagok előnyösen csont-morfogenikus fehérjék (BMP–2 és BMP–7), oszteogén fehérjék (OP–1), növekedési faktorok (pl. TGF-béta 1) és citokinek (pl.

IFN-béta) lehetnek. Az említett hatóanyagokat helyi úton különböző hordozóanyagokban (pl. hidroxiapatit és/vagy kalcium-karbonát és aminosavak) alkalmazhatjuk. A PTHrP analógok szisztémás adagolása továbbá a törésgyógyítás alternatív módszereivel (pl. mechanikus vagy biofizikai serkentés, pl. elektromos árammal vagy ultrahanggal történő kezelés) kombinálható.

A PTHrP analógokat gyógyászati alapon nem toxikus hordozóanyagokat tartalmazó gyógyászati készítmények alakjában alkalmazhatjuk. A parenterális (szubkutáns, intramuszkuláris vagy intravénás) készítmények általában folyékony oldatok vagy szuszpenziók. Orális vagy bukkális adagoláshoz előnyösen tablettákat vagy kapszulákat, intranazális adagoláshoz előnyösen porokat, orrcseppeket vagy aeroszolokat alkalmazhatunk. A készítmények továbbá rektálisan vagy transzdermálisan adagolhatók.

A parenterális adagolásra szolgáló folyékony készítmények excipientsként steril vizet vagy konyhasóoldatot, alkilénlikolokat (pl. propilénlikol) polialkilénlikolokat (pl. polietilénlikol), növényi eredetű olajokat, hidrogénezett naftalinokat stb. tartalmazhatnak. A készítményekhez enyhén savas (pH kb. 4–6) puffereket adhatunk. Pufferként előnyösen kb. 5–50 mM koncentrációjú acetát-, aszkorbinát- és citrátpufferek alkalmazhatók. Az orális adagolásra szolgáló készítmények epesókat vagy akrilamitineket is tartalmazhatnak. Nazális adagolásra excipientsként (pl. laktóz vagy dextrán) tartalmazó szilárd készítmények, vagy vizes vagy olajos oldatok (pl. orrcseppek vagy beosztással ellátott spray-k) alkalmazhatók. A nazális készítmények előnyösen szokásos szárazpor-inhalerekben (DPI) felhasználható száraz porok, ködképzésre felhasználható folyékony oldatok vagy szuszpenziók, valamint beosztással ellátott inhalerekben (MDI) felhasználható spraykészítmények lehetnek. A bukkális készítmények excipientsként cukrot, kalcium-sztearátot, magnézium-sztearátot, előzsztatinált keményítőt stb. tartalmazhatnak.

A nazális adagolásra szolgáló készítményeknek az orr nyálkamembránján keresztül történő abszorpcióját felületaktív savakkal segíthetjük elő. E célra pl. glikokólsavat, kólsavat, taurokólsavat, ethokólsavat, deoxikólsavat, kenodeoxikólsavat, dehidrokólsavat, glikodeoxikólsavat és ciklodextrineket alkalmazhatunk, általában kb. 0,2–15 tömeg%, előnyösen kb. 0,5–4 tömeg%, különösen előnyösen kb. 2 tömeg% mennyiségben.

A találmány szerinti vegyületeknek a kezelendő beteg számára hosszabb időn át (pl. egy hét és egy év közötti időtartam) történő adagolását késleltetett hatóanyag-leadású rendszer segítségével egyetlen beadással is elvégezhetjük. A retardrendszer a kívánt időn át történő elnyújtott adagoláshoz elegendő mennyiségű hatóanyagot tartalmaz. E célra különböző szabályozott hatóanyag-leadású rendszerek alkalmazhatók, pl. monolitikus vagy tartány típusú mikrokapszulák, depotimplantátumok, ozmotikus szivattyúk, vezikulumok, micéliumok, liposzomák, transzdermális tapa-

szok, iontofer készülékek és alternatív befecskendezhető adagolási formák. Bizonyos rendellenességek kezelése esetén a szabályozott hatóanyag-leadású készítményekkel szemben azt a további követelményt támasztjuk, hogy a hatóanyag leadása a hatás helyén lokalizálva történjen.

Találmányunk további részleteit az alábbi példákban ismertetjük, anélkül, hogy a találmányt a példákra korlátoznánk.

Példák

Referenciapéldák

Tabletták készítése

Az alábbi komponenseket bensejében összekeverjük és egyosztásos tablettákká préseljük.

Komponens	Mennyiség, mg/tabletta
Találmány szerinti vegyület	400
Kukoricakeményítő	50
Kroszkarmellóz-nátrium	25
Laktóz	120
Magnézium-sztearát	5

Kapszulák készítése

Az alábbi komponenseket bensejében összekeverjük és keményszelatin-kapszulákba töltjük.

Komponens	Mennyiség, mg/kapszula
Találmány szerinti vegyület	200
Laktóz, porlasztva szárított	148
Magnézium-sztearát	2

Szuszpenzió készítése

Az alábbi komponensek összekeverésével orális adagolásra alkalmas szuszpenziót készítünk.

Komponens	Mennyiség
Találmány szerinti vegyület	1,0 g
Fumársav	0,5 g
Nátrium-klorid	2,0 g
Metil-parabén	0,15 g
Propil-parabén	0,05 g
Cukor, granulált	25,5 g
Szorbit (70%-os oldat)	12,85 g
Veegum K (Vanderbilt Co.)	1,0 g
Ízesítőanyag	0,035 ml
Színezőanyag	0,5 mg
Desztillált víz	q.s. 100 ml

Injekciós készítmény

Az alábbi komponensek összekeverésével injekciós készítményt állítunk elő.

Komponens	Mennyiség
Találmány szerinti vegyület	0,2 g
Nátrium-acetát-pufferoldat, 0,4 M	2,0 ml
1 n sósav vagy 1 n nátrium-hidroxid	q.s. megfelelő pH-értékig
Víz (steril desztillált víz)	q.s. 20 ml

Orrcsepp

Az alábbi komponensek összekeverésével az orrba becspegethető szuszpenziót készítünk.

Komponens	Mennyiség
PTHrP analóg	20 mg/ml
Citromsav	0,2 mg/ml
Nátrium-citrát	2,6 mg/ml
5 Benzalkónium-klorid	0,2 mg/ml
Szorbit	35 mg/ml
Nátrium-taurokolát vagy glikokolát	10 mg/ml

1. példa

10 Szegmentált töréshiány gyógyítása PTHrP analógokkal

A PTHrP analógok csontgyógyulást és törés-helyreállítását megkönnyítő hatásának igazolására a szegmentált femorális hiány patkánymodell módosított változatát alkalmazzuk [T. A. Einhorn et al. J. Bone Joint, 66:274–279 (1984)].

15 Kb. 300 g testtömegű felnőtt hím Sprague–Dawley-patkányokat laboratóriumi 5001 sz. patkánytápon tartunk (PMI Feeds, St. Louis, MO, USA) és az állatok vizet ad libitum kapnak. Minden patkány a műtét előtt 12 óráig csak vizet kap. Az állatokat a műtét előtt ketamin (80 mg/kg) és xilazin (5 mg/kg) intraperitoneális befecskendezésével érzéstelenítjük. Fertőzés megelőzése céljából egyetlen dózisban intramuszkulárisan prokain penicillint fecskendezünk be.

25 A combcsontot laterálisan tárjuk fel és a combcsont elülső kérge mentén előre kifűrt nagy sűrűségű polietilénlemezt rögzítünk. A lemez elhelyezése alatt a combcsonttól a csontthártyát extenzíven lehántjuk. A combcsont tengelyének középső részében 1 mm-es nem kritikus méretű szegmentális hiányt alakítunk ki. A sebet nejlon- és króm varrattal lezárjuk.

35 A patkányokat műtét után ketrecekbe helyezjük és az állatok 48 órán át pellet formájában kapnak táplálékot. Az állatokat naponta legalább egyszer megfigyeljük, a betegség jeleit mutató állatokat megvizsgáljuk és szükség esetén gyógykezelésnek vetjük alá.

40 A patkányokat az 1. táblázatban leírt csoportokba osztjuk. A kontrollcsoport állatai hordozót (konyhasóoldat), míg a kezelt csoport állatai PTHrP analógot kapnak. A konyhasóoldatot, illetve a tesztvegyületet az operáció utáni első nappal kezdődően naponta szubkutáns módon adagoljuk. Hetenként radiográfiai analízist végzünk. Az állatokat 6 hét után leöljük és a radiográfiai eredményeket összehasonlítjuk.

45 Szedált patkányokat hasra fektetünk és a hátsó végtagokat forgatjuk. Az operáció utáni első héttel kezdődően mindegyik combcsonttól (a kezelt combcsonttól és a szemben levő combcsonttól egyaránt) hetente radiográfsorozatot készítünk. Kalibráció céljából minden radiográfba ismert sűrűségértékű alumínium „fantom”-lemezt helyezünk. Az egyes radiográfokat átvilágított lemezre helyezük és a felvételt DCS 420 digitális Kodak kamera segítségével készítjük el. A képeket ezután Gateway 2000 IBM kompatibilis komputerre visszük át és képanalízis-szoftware (Sigma Scan®) felhasználásával digitalizáljuk. A csontthiány alakulását nyomon követjük, és az osteotómia területének átlagos sűrűségét a kezelt csoport állatainál mérjük és a kontrollpatkányokkal kapott eredményekkel összehasonlít-

juk. Az 1. ábrán az osteotómiának a kezelt állatokon mért csontsűrűségét a kontrollpatkányoknál kapott megfelelő értékekhez viszonyítjuk hetenként, a kezelés első 5 hetében. Az osteotómia átlagos sűrűségét továbbá hetenként a kontralaterális combcsont átlagos sűrűségével is összehasonlítjuk. A 2. ábrán a 6 hét után mért radiográfiai sűrűségarányt tüntetjük fel. A csontsűrűségek összehasonlítása azt mutatja, hogy a PTHrP analógok csontgyógyító hatással rendelkeznek. Az állatok leölése után (6 hét) a combcsontokat

(kezelt és kontralaterális combcsontok) a lágyszövetektől megszabadítjuk. A combcsontokról oldalsó finom szemcsés radiográfokat készítünk. Az osteotómiát összeforrtnak tekintjük, ha a hiány keresztmetszetenek több mint 20%-ában csontfolytonosság tapasztalható. A kezelt és kontrollállatok combcsontjának összehasonlítása azt mutatja, hogy a PTHrP analógok a csontgyógyulást és törés-helyreállítást gyorsítják. A 3. ábrán a kontroll- (1A. ábra) és kezelt (1B. ábra) állatok jellegzetes radiográfjait tüntetjük fel.

1. táblázat

Csoport	Tesztvegyület	Adagolás módja	Állatok száma	Leölés időpontja
1.	kontroll	szubkutáns	10	6 hét
2.	PTHrP B analóg	szubkutáns	10	6 hét
3.	PTHrP C analóg	szubkutáns	10	6 hét

2. példa

Csontgyógyulás vizsgálata PTHrP analógokkal, zárttöréses csonthiány modellben

Zárttöréses csonthiány modellként a Bonnarens/Einhorn modellt alkalmazzuk [F. Bonnarens and T. A. Einhorn, J. Orthopaedic Research, 2:97–101 (1984)]. A patkányokat az 1. példánál leírt módon használjuk fel. Ennél a modellnél a disztális combcsontba belső parapatelláris feltárással velőúri szeget helyezünk. Az ízületi metszést ezután nem felszívódó varratokkal lezárjuk és a velőúri szeget a helyén hagyjuk. Hárompontos ütőeszközzel zárt keresztirányú törést idézünk elő. Az állatok megfigyelését és a radiográfiai elemzést az 1. példában leírt módon végzzük el. A modellnél kapott eredmények szerint a PTHrP analógok a csontgyógyulást és törés-helyreállítást a kezelt állatokon a kontrollhoz viszonyítva gyorsítják.

3. példa

Membránon belüli csontgyógyítás PTHrP analógokkal

Nyulakat általános érzéstelenítésnek vetünk alá és sebészeti beavatkozással négy felülethiányt hozunk létre, és pedig egyet-egyet a disztális combcsontokon és egyet-egyet a proximális sípcsontokon. A disztális laterális combcsont condylus feltáráshoz utólag kb. 3 cm-es laterális sebészeti bemetszést ejtünk. A térdízülethez közeli csontot a csonthártya alatt feltárjuk és 5 mm-es lyukat fúrunk, miközben a fúró állandó öblítéssel hűtjük. A sebet normál konyhasóoldattal öblítjük. A mélyszövetet folyamatos 3–0 varrattal lezárjuk, majd a subcutanális réteget folyamatos 3–4 nejlonvarrattal és három-négy megszakított rozsdamentes acél varrattal bevarrjuk. A mediális proximális sípcsonton egy második 3 cm-es vágást ejtünk és a proximális mediális sípcsonton 5 mm-es lyukat fúrunk. A sebet az előzőekben leírt módon lezárjuk. A fenti teljes eljárást az ellenoldali (kontralaterális) végtagon is elvégezzük.

A PTHrP C analógból,

(MAP_{1–10})^{22–31}His²⁰hPTHrP(1–34)NH₂ és PTHrP D analógból, (MAP_{1–10})^{22–31}hPTHrP(1–34)NH₂ 800 µg/ml koncentrációjú törzsoldatokat készítünk, amelyeket 0,22 mikronos steril szűrőn átszűrünk és hordozóanyaggal közvetlenül a felhasználás előtt 20 µg/ml vagy 100 µg/ml értékre hígítunk. Hordozóanyagként 30 mg/ml mannitot, 30 mg/ml szacharózt, 0,12 mg/ml Tween® 80-at, 0,17 mg/ml ecetsavat és 2,33 mg/ml nátrium-acetát-trihidrárt alkalmazunk. A sebészeti kezelést állatokba 2 µg/kg/nap vagy 10 µg/kg/nap dózisban szubkutáns úton naponta PTHrP analógot fecskendezünk.

Az állatokat a vizsgálat során hetenként röntgenvizsgálatnak vetjük alá. Átvilágított szkennert és MetaMorph® (Universal Imaging, West Chester, PA) software felhasználásával denzitometriai méréseket végzünk. Az alsó végtagok radiográfját belső és külső forgásban a műtét utáni 10. és 21. napon készítjük el. Az állatokat a műtét után 30 nappal leöljük. A vizsgálat végén az állatokat túl-adagolt pentobarbitállal eutalizáljuk, majd a bal és jobb combcsontokról és sípcsontokról gyűjtött szöveteket röntgenvizsgálatnak és hisztológiai elemzésnek vetjük alá.

A PTHrP C és D analóggal kezelt állatok a hordozóval kezelt nyulakhoz viszonyítva gyorsított membránon belüli csontképződést mutatnak. A PTHrP D analógnak a combcsonton és sípcsonton kifejtett hatását a 4A. és 4B. ábrán tüntetjük fel. A 21. napon a kontrollcsoport állatainál egyetlen combcsonthiány vagy sípcsonthiány sem gyógyult be teljesen, míg az alacsony dózissal kezelt csoportban az állatok 40%-ának combcsonthiánya és sípcsonthiánya meggyógyult. Ebben az időpontban a magasabb dózissal kezelt csoport állatainál a sípcsonthiányok 75%-a és a combcsonthiányok 50%-a meggyógyult. Az állatok leölésekor elvégzett radiográfiai elemzés a PTHrP analóggal kezelt állatoknál a gyógyulás előrehaladását igazolta; a magas dózissal kezelt csoport állatainál a sípcsonthiányok több mint 85%-a mineralizált szövetet megtelt, míg a kontrollcsoport állatainál ugyanez az érték 10% alatt van (p<0,01). Hasonlóképpen a PTHrP-vel kezelt csoportban a

combcsonthiány feltöltődése szignifikáns mértékben nagyobb, mint a kontrollcsoport állatainál ($p < 0,01$).

4. példa

Fokozott csontgyógyulás az singcsonti osteotómiamodelben

A kísérlet célja annak igazolása, hogy PTHrP analógok patkány osteotómiamodelben szisztémás kortikoszteroid gyógykezelés esetében növelik a biomechanikai szilárdságot (I. rész) és a gyógyulás kinetikáját (II. rész) javítják.

A kísérlethez felnőtt him új-zélandi fehér nyulat használtunk. Az I. részben 10 nyulat, míg a II. részben 20 nyulat két egyforma csoportra osztunk. Minden nyúl bilaterálisan nem kritikus nagyságú csonthiányt (1 mm) idézünk elő. A sebészeti beavatkozás előtt 2 hónappal kezdődően a műtét után 6 hétig minden nyúl naponta szubkutáns injekció formájában steril vízben prednizolonoldatot (0,15 mg/kg; kísérleti csoport) vagy steril konyhasóoldatot (kontrollcsoport) kap. Az operáció utáni első nappal kezdődően a kísérleti csoport állataiba naponta szubkutáns injekció formájában PTHrP D analógot (0,01 mg/kg) fecskendezünk, míg a kontrollcsoport állatai normál konyhasóoldat-injekciót kapnak. A I. rész szerint az állatokat az osteotómia elvégzése után 6 héttel leöljük. A II. rész szerinti kísérletnél az állatokat a bilaterális radiográfiai összeforrás után vagy – ha a sérülés nem forrt össze – 10 héttel a műtét után leöljük.

Mindkét kísérletsorozatnál a radiológiai intenzitást és a gyógyult területet a műtét után két héttel (I. rész) vagy 4 héttel (II. rész) kezdődően minden második héten elemezzük. Az első végtagokról radiográf sorozatot készítünk és digitalizálunk, ill. a csontok területét image analízis szoftware felhasználásával mennyiségileg meghatározzuk (Sigma Scan Pro). Az osteotómia és a hegképződés helyén újonnan keletkezett csontok ásványianyag-tartalmát fotodenzitometria segítségével meghatározzuk. Az állatok leölése után mindkét végtagról az előlről hátra irányuló és oldalirányú síkban nagy feloldású faxitron radiográfokat készítünk, majd a törési csonthegek méretét és nagyságát elemezzük.

Eredmények (1. rész)

A PTHrP D analóggal kezelt 10 végtag közül 9 hat hét alatt összeforrt, míg a hordozóval kezelt kontrollcsoportnál 10 végtagból csak 2 forrt össze. Az eredményeket az 5. ábrán tüntetjük fel. Hat hét után az előlről hátra irányuló és oldalirányú faxitronok a PTHrP analóggal kezelt csoportban az csontmetszések helyeken szignifikáns mértékben nagyobb intenzitást mutatnak, mint a hordozóval kezelt kontrollvégtagok esetében. Hasonlóképpen a proximális és disztális singcsont diafizisek intenzitása a kezelt végtagokon szintén szignifikáns mértékben nagyobb. A kezelt állatokon az externális csontteg intenzitása laterálisan is nagyobb. Biomechanikai szempontból a PTHrP analóggal kezelt végtagok torziós szilárdsága szignifikáns mértékben nagyobb, mint a hordozóval kezelt kontrollvégtagok esetében; ez mind a keménységre, mind a maximális csavarási nyomatéokra vonatkozik.

Eredmények (II. rész)

Négy hét után a kezelt végtagok az osteotómia helyén nagyobb radiográfiai intenzitást mutatnak, mint a kontrollvégtagok ($p < 0,01$); ez a külső csonthegekre, és a singcsonti diafizisekre egyaránt vonatkozik. A kezelt végtagok kombinált csonthegterülete nagyobb ($p < 0,05$), ami azt jelzi, hogy az osteotómia helye méreteiben csökken. A hat hét után készített in vivo radiográfia azt mutatja, hogy az osteotómia helyén a kezelt végtagok csontintenzitása nagyobb, mint a kontrollcsoport esetében, bár a csonthegintenzitás vagy -nagyság terén különbségeket nem tapasztaltunk. Radiográfiai-
lag valamennyi PTHrP analóggal kezelt végtag összeforrtnak tekinthető és az állatokat 6 hét után leöltük. A 8. héten négy további végtag (2 állat) radiográfiai vizsgálat szerint összeforrt és ezeket az állatokat is leöltük. A 10. héten a megmaradt állatokat leöltük, mert végtagjaik az előző 4 hetes időszakhoz viszonyítva a gyógyulás terén radiográfiai javulást nem mutattak, és így megállapítottuk, hogy a csontok nem forrtak össze. A PTHrP analóggal kezelt végtagok az osteotómia helyén nagyobb radiográfiai intenzitást ($p < 0,05$), valamint nagyobb singcsontdiafizist és csonthegterületet mutatnak. Az osteotómia területe a PTHrP analóggal kezelt végtagok esetében szignifikáns mértékben kisebb, mint a hordozóval kezelt kontrollcsoportban. A kortikoszteroiddal előidézett késleltetett gyógyulás modelljében a PTHrP analóggal kezelt csoportban 6 hét után teljes összeforrást tapasztaltunk, míg a kezeletlen végtagok 75%-a 10 hét után sem mutatta az összeforrás jeleit.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Paratiroid hormonnal rokon peptid (PTHrP) olyan polipeptidanalógjainak és ezek sóinak felhasználása csontgyógyításra és törés-helyreállításra szolgáló gyógyászati készítmények előállítására, ahol az analóg egy 30–50 aminosavmaradékot tartalmazó N-terminális rövidített szekvencia, amelyben a PTHrP analóg 22–31 aminosavmaradéka amfipatikus alfa-hélexet képez, és az amfipatikus alfa-hélex a
Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu
képletnek felel meg – a képletben Xaa pozitív töltést hordozó aminosavmaradékot jelent.
2. Az 1. igénypont szerinti felhasználás nazálisan adagolandó gyógyászati készítmény előállítására.
3. Az 1. igénypont szerinti felhasználás a törés helyére egy második csontgyógyító szer helyi alkalmazásával párhuzamosan adagolandó gyógyászati készítmény előállítására.
4. Az 1. igénypont szerinti felhasználás membránon belüli csonttörés kezelésére szolgáló gyógyászati készítmény előállítására.
5. Az 1. igénypont szerinti felhasználás szisztémásan adagolandó gyógyászati készítmény előállítására.
6. Az 1. igénypont szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy Xaa jelentése lizin vagy hisztidin.
7. A 6. igénypont szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys
Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys
Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID NO: 3);
vagy

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys
Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu His
Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID NO: 4)
képletű PTHrP analógot alkalmazunk.

8. Az 1. igénypont szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy olyan PTHrP analógot alkalmazunk, amelyben legalább két aminosavmaradék oldalláncán keresztül kapcsolódik egymáshoz.

9. A 8. igénypont szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy olyan PTHrP analógot alkalmazunk, amelyben a kapcsolódó aminosavmaradékok a 13- és 17-, vagy 26- és 30-helyzetben helyezkednek el.

10. A 9. igénypont szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy olyan PTHrP analógot alkalmazunk, amely a 17-helyzetben levő aminosavmaradékként aszparaginsavat tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly

Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu
Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr hSerlac (SEQ ID
NO: 5); vagy

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly

Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu
Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID
NO: 6)

képletű PTHrP analógot alkalmazunk.

12. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy PTHrP analóggént az 5-, 13-, 17-, 19-, 26-, 30-, 32- és/vagy 34-helyzetben adott esetben helyettesített 30–50 aminosavmaradékot tartalmazó N-végállású rövidített szekvenciát alkalmazunk.

13. A 12. igénypont szerinti felhasználás, *azzal jellemezve*, hogy alábbi képletű PTHrP analógot alkalmazunk:

10 Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly
Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu
Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID
NO: 7),

15 Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly
Lys Ser Ile Gln Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu
Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID
NO: 8),

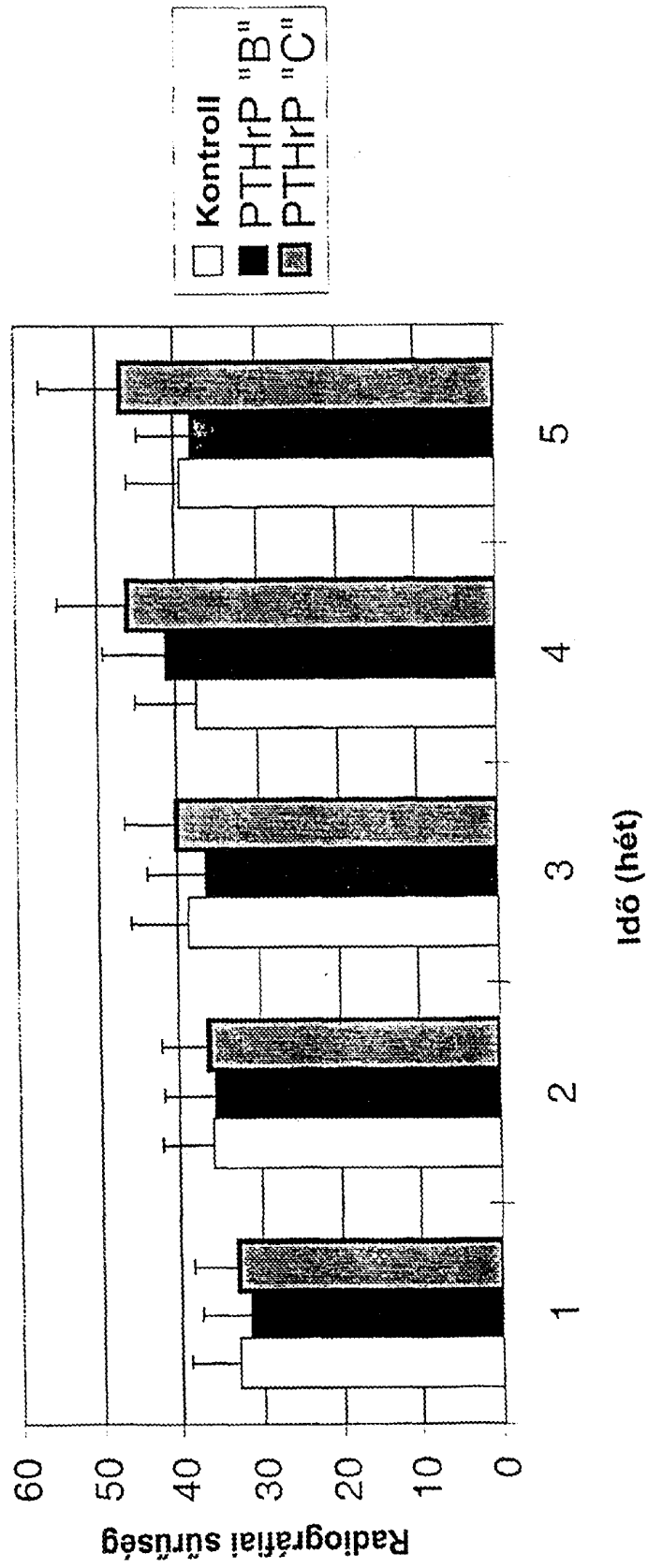
20 Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys
Ser Ile Gln Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys
Leu Leu Glu Lys Leu Pro NH₂ (SEQ ID NO: 9),

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys
Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys
Leu Leu Glu Lys Leu His Thr D-Orn laktám (SEQ ID
NO: 10),

25 Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys
Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys
Leu Leu Glu Lys Leu His Thr hSer laktám (SEQ ID
NO: 11) vagy

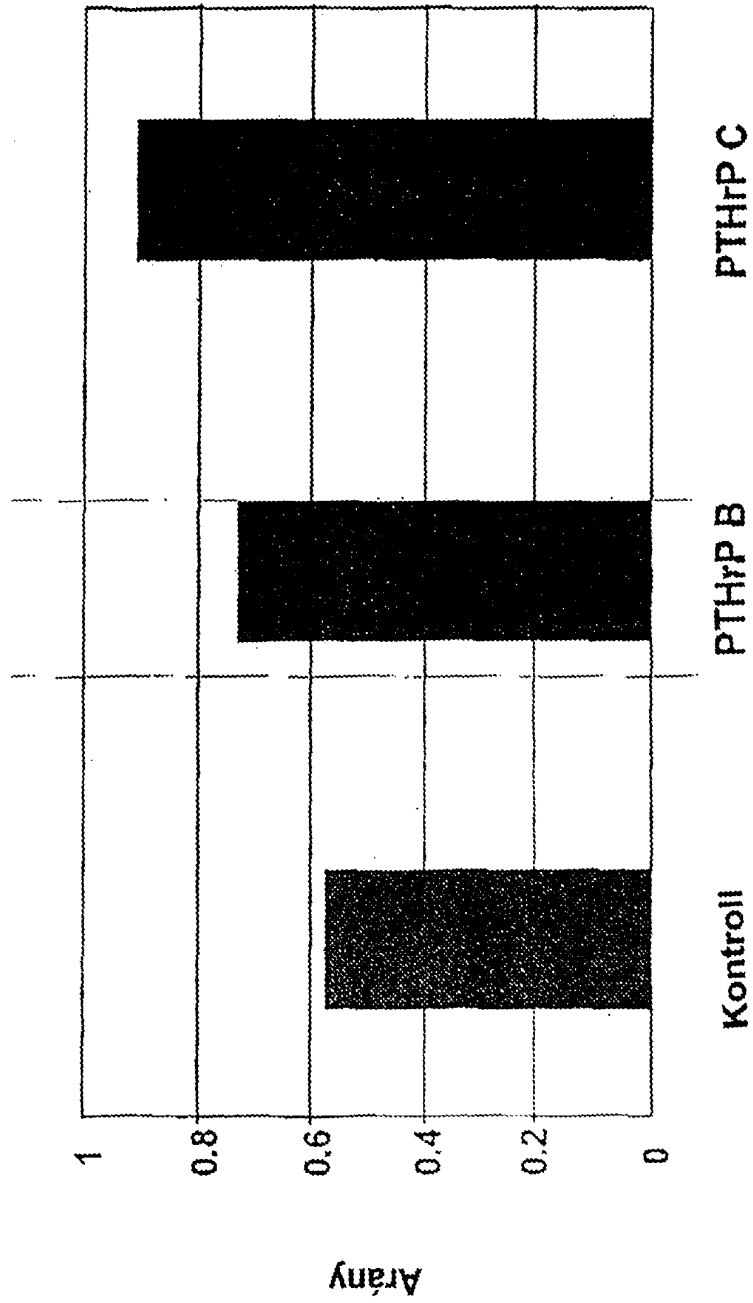
30 Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys
Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys
Leu Leu Glu Lys Leu His Thr hSer Thr His Ile Gln NH₂
(SEQ ID NO 12).

PTHrP, csontíány-vizsgálat



1. ábra

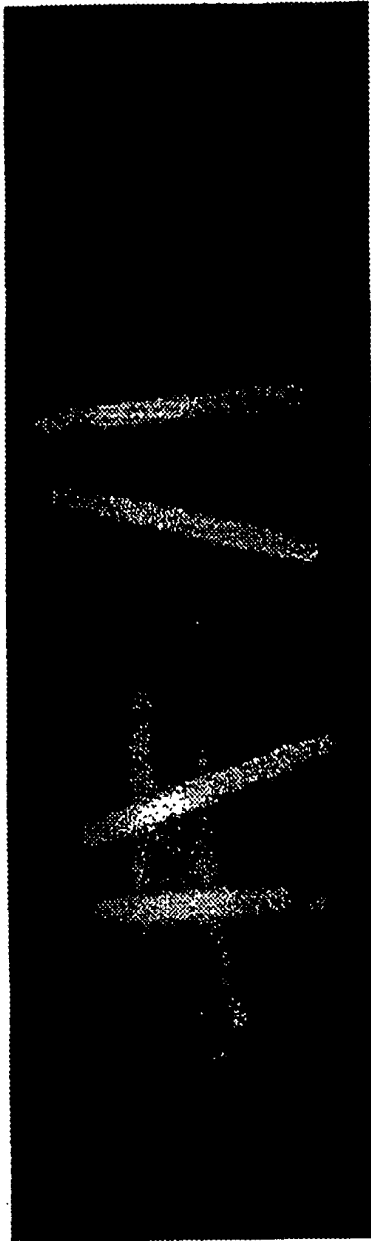
Csonthiányos/contralaterális combcsont radiográfiai sűrűség aránya



6 hét

2. ábra

**Beforratlan csontiány
nagy felbontású röntgenképe
a 6. héten**

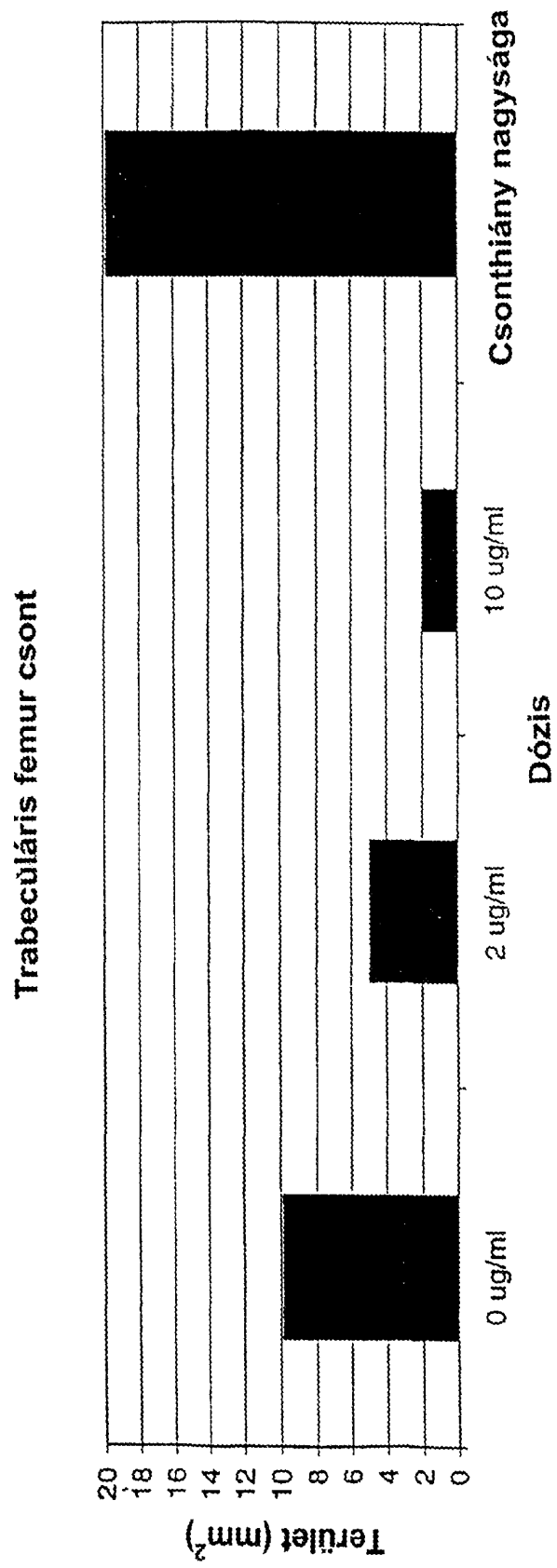


3A. ábra

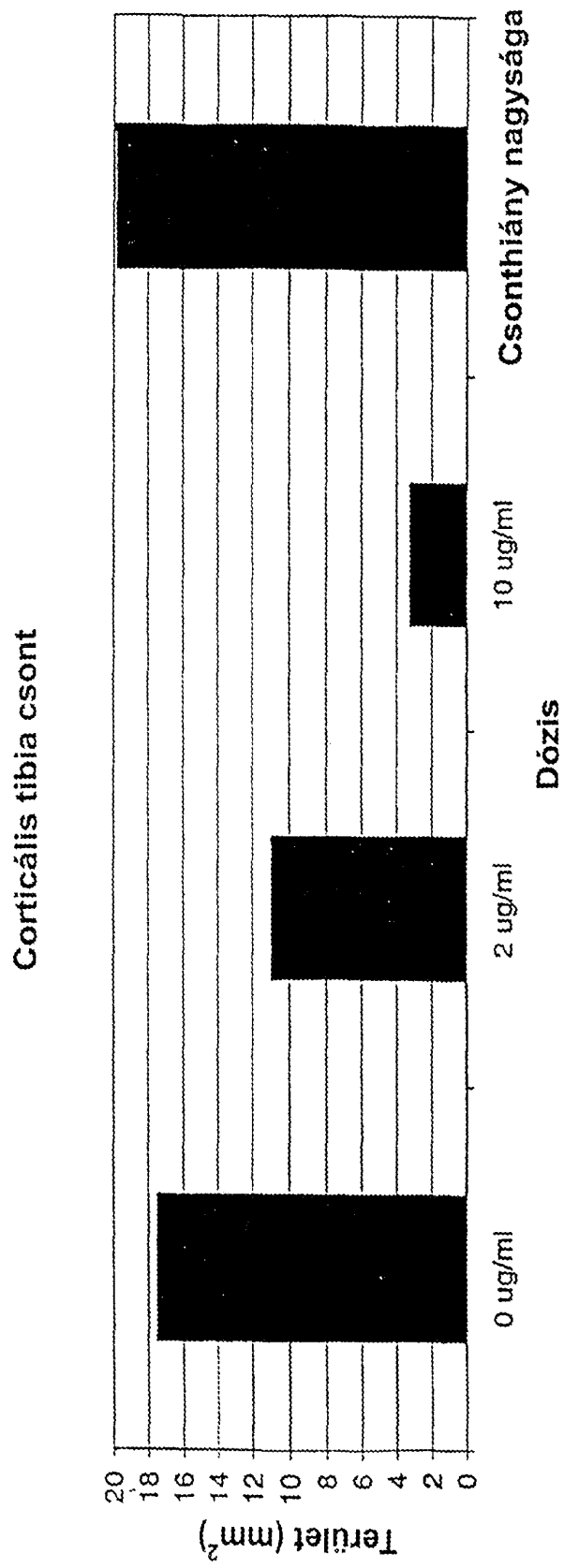
**Gyógyult csontiány nagy
felbontású röntgenképe
a 6. héten**



3B. ábra

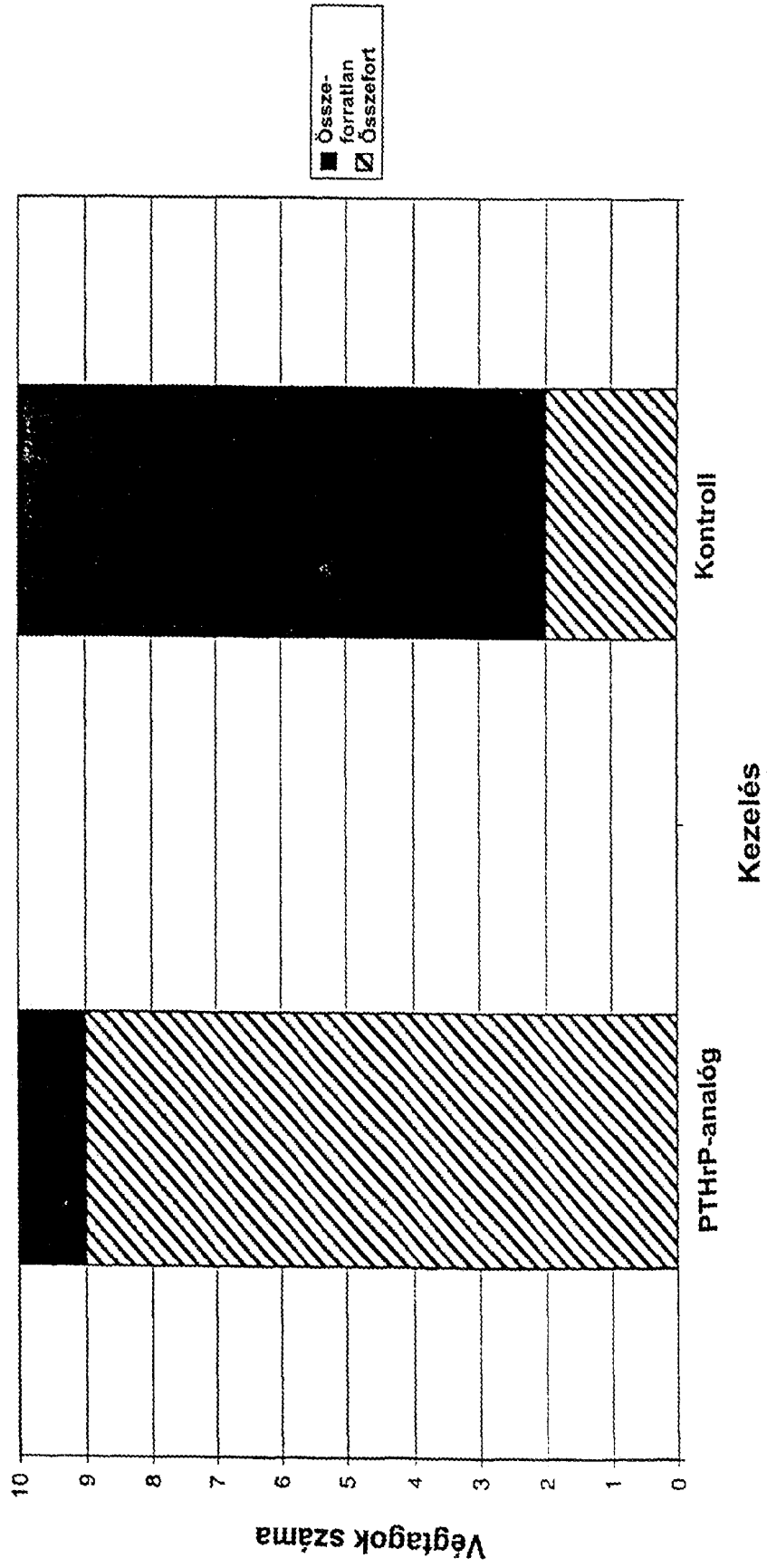


4A. ábra



4B. ábra

Összeforrás mértéke, a 6. héten



5. ábra

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
Felelős vezető: Törőcsik Zsuzsanna
Windor Bt., Budapest