

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) **FI 953255 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **953255**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C07K 14/585
A61K 38/23**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **30.12.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **30.06.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **30.06.1995**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **30.12.1993 PCT/US1993/012692**
Internationell ansökan - International
application

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

31.12.1992 US 999749

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • ZymoGenetics, Inc., 4225 Roosevelt Way, N.E. Seattle, WA 98105, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • University Of Washington, Seattle, Washington United States, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Labroo, Virender, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • Sasaki, Tomikazu, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Derivarisoidut kalsitoniinit

Derivatiserade kalcitoniner

Derivatisoidut kalsitoniinit - Derivatiserade kalcitoniner

Luu on dynaaminen kudος ja aikuisen luuston homeostaasi edellyttää uuden luun muodostumisen ja aiemmin muodostuneen luun resorption välistä tasapainoa. Kalsiinilla, nisäkkäiden kilpirauhasen ja kateenkorvan erittämällä peptidihormonilla, on tärkeä osa luun homeostaasin ylläpitämisessä. Kalsitoniini sitoutuu reseptoreihin, joita on luunsyöjäsoluissa, luukudoksen soluissa, jotka välittävät luun resorptiota. Kalsitoniini immobilisoi luunsyöjäsolut estäen siten luun resorption, minkä seurauksena luun seerumiin vapauttaman kalsiumin määrä laskee. Tätä luun resorptiota on käytetty hyväksi käyttämällä kalsitoniinia osteoporoosin hoitoon.

Kalsitoniinia esiintyy nisäkkäiden kilpirauhasissa ja alempien selkärankaisten viimeisissä kidusrauhasissa. Kaikki tunnetut luonnollisesti esiintyvät kalsitoniinit ovat 32 aminohapon polypeptidejä, joissa on amidoitunut karboksyyli-terminaali ja molekyyllinsisäinen disulfididisidos 1 ja 7 asemissa olevien kysteiniinitähteiden välissä.

Osteoporoosin hoidossa lohen kalsitoniini on nykyisin edullinen verrattuna ihmisen kalsitoniiniin. Lohen kalsitoniinin maailmankauppa yltää vuosittain 500 miljoonaan dollariin. Lohen kalsitoniini on osoittautunut merkittävästi tehokkaammaksi pysäytettäessä luun resorptiota kuin ihmisen kalsitoniinin muodot. On olemassa useita hypoteesejä siitä, miksi lohen kalsitoniini on tehokkaampaa hoidettaessa osteoporoosia kuin ihmisen kalsitoniini. Nämä hypoteesit ovat: 1) lohen kalsitoniini on hajoamiselle vastustuskykyisempää, 2) lohen kalsitoniinin aineenvaihdunnallinen puhdistumanopeus (MCR) on hitaampi ja 3) lohen kalsitoniinin konformaatio voi olla hieman erilainen, mikä saa aikaan suuremman affiniteetin luureseptorikohtiin.

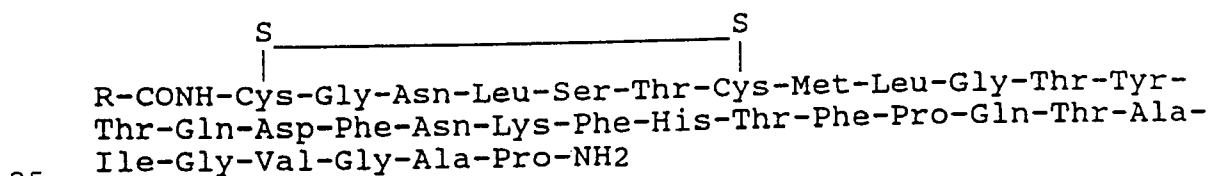
Huolimatta lohen kalsitoniinin käyttöön ihmisten osteoporoosin hoitoon liittyvistä eduista, siinä on myös haittoja.

Lohen kalsitoniini annetaan injektoimalla, menetelmällä, joka on monista potilaista sietämätöntä. Lisäksi joissakin potilaissa kehittyy ei-humaani-kalsitoniinin vasta-aineita. Siksi tarvitaan uusia lohen, ihmisen tai muiden kalsitoniinien analogeja, jotka ovat luun resorption tehokkaita inhibiittoreita ja jotka ovat halvempia, sopivampia annettaviksi ja ei-immunogeenisiä.

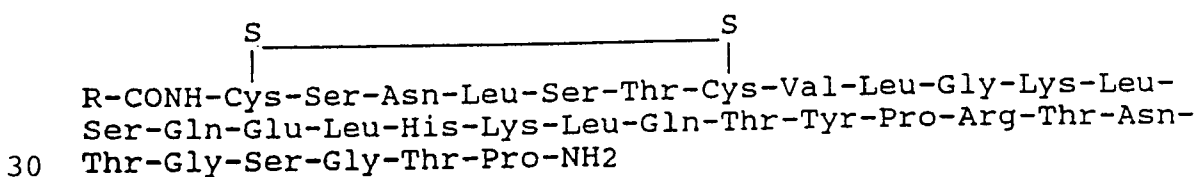
Esillä olevan keksinnön kohteena on saada aikaan uusia kalsitoniinijohdannaisia, joiden hypokalseeminen aktiivisuus on parantunut ja/tai joiden puoliintumisaika in vivo on pidentynyt.

Keksinnön eräänä kohteena on saada aikaan farmaseuttisia koostumuksia, jotka käsittävät uusia kalsitoniinijohdannaisia, sekä menetelmiä potilaiden seerumin kalsiumin vähentämiseksi antamalla farmaseuttisia koostumuksia.

Eräässä kohteessa esillä oleva keksintö saa aikaan yhdisteitä, jotka on valittu ryhmistä, jotka koostuvat



(sekvenssi ID-numero 1),



sekvenssi ID-numero 2)

35 ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävistä suoloista, joissa R on substituoitu tai substituoimaton biaryyli, joka sisältää optionaalisesti 1 tai 2 rengastyyppiä atomia rengasta kohti, substituoitu tai substituoimaton heterosykloalkyyli, joka sisältää 1 tai 2 rengasheteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu, N:stä, S:stä ja O:sta, substituoitu tai substituoimaton bis-heterosykloalkyyli,

joka sisältää 1 tai 2 heteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä ja O:sta, tai substituoitu tai substituoiaton heteroaryyli, joka sisältää 1-4 heteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä ja O:sta.

Eräänä kohteena esillä oleva keksintö saa aikaan yhdisteitä, joiden kaava on R-N-CT, jossa CT on kalsitoniini, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ihmisen, lohen, ankeriaan, rotan, sian, naudan, lampaan ja kananpojan kalsitoniineista ja niiden biologisesti aktiivisista johdannaisista ja varianteista tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävistä suoloista, N on amidikytös ja R on substituoitu tai substituoiaton biaryyli, joka sisältää optionaalisesti 1 tai 2 rengastyyppiä rengasta kohti, substituoitu tai substituoiaton heterosykloalkyyli, joka sisältää 1 tai 2 rengasheteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä tai O:sta, substituoitu tai substituoiaton bis-heterosykloalkyyli, joka sisältää 1 tai 2 heteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä ja O:sta, tai substituoitu tai substituoiaton heteroaryyli, joka sisältää 1-4 heteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä ja O:sta.

Eräänä kohteena esillä oleva keksintö saa aikaan yhdisteitä, joiden kaava on $X-(R-N-CT)_n$, jossa X on siirtymämetallin ioni, R on heterosykloalkyyli- tai heteroaryyliryhmä CT on kalsitoniini, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ihmisen, lohen, ankeriaan, rotan, sian, naudan, lampaan ja kananpojan kalsitoniineista ja niiden biologisesti aktiivisista johdannaisista ja varianteista, N on amidikytös ja $n = 2$ tai 3 . Saadaan aikaan myös näiden yhdisteiden farmaseuttisesti hyväksyttäviä suoloja.

Edellä selostettuihin yhdisteisiin yhdistetään farmaseuttisesti hyväksyttävää kantoainetta farmaseuttisten koostumusten valmistamiseksi. Nämä koostumukset ovat käyttökelpoisia muun muassa potilaan seerumin kalsiumin vähentämiseen.

Lyhenneluettelo

	DMSO	Dimetyylisulfoksidi
	BHA	Bentshydriyliamiini
	MBHA	4-metyyllibentshydriyliamiini
5	Fmoc	9-fluorenyylimetoksykarbonyyli
	BOC	t-butyylisoksykarbonyyli
	Trit	Trityyli
	But	t-butyyli
	PMC	2,2,5,7,8-pentametyyli-kromaani-6-sulfonyyli
10	BOP	Bentsotriatsolyyli-N-oksi-trisdimetyyliamino-fosfoniumheksafluorifosfaatti
	PyBOP	Bentsotriatsol-1-yyli-oksi-tris-pyrrolidinofosfoniumheksafluorifosfaatti
	PyBrop	Bromi-tris-pyrrolidinofosfoniumheksafluorifosfaatti
15	HBTU	[2-(1H-bentsotriatsol-1-yyli)1,1,3,3-tetrametyyliuroniumheksafluorifosfaatti
	HOBt	1-hydroksibentsotriatsoli
	DIEA	Di-isopropyylietyyliamiini
20	Et ₃ N	Trietyyliamiini
	DMF	Dimetyyli-formamidi
	NMP	N-metyylipyrrolidoni
	HPLC	Suuren suorituskäyvyn nestekromatografia
	AAA	Aminohappoanalyysi
25	DCM	Metyleenikloridi
	SCT	Lohen kalsitoniini
	TFA	Trifluorietikkahappo
	DIC	Di-isopropyyli-karbodi-imidi
	DCC	Disykloheksyylikarbodi-imidi
30	FAB-MS	Nopea atomipommitus - massaspektroskopia

Kuviot 1, 2 ja 3 esittävät tuloksia testistä, jossa mitataan seerumin kalsiumtasoa käyttämällä yhdistettä, joka on esillä olevalle keksinnölle tyypillinen. BP_{4,4}-CT (ZP-1) on derivatisoitu kalsitoniiniyhdiste ja SCT on lohen kalsitoniini.

Esillä oleva keksintö saa aikaan uusia derivatisoituja kalsitoniinimolekyylejä. Nämä molekyylit saadaan sekä monomee-

risissä että multimeerisissä muodoissa. Esillä olevan keksinnön mukaisissa derivatisoiduissa kalsitoniineissa on verrattuna nykyisin saatavissa oleviin kalsitoniineihin erilaisia etuja, kuten suurempi spesifinen aktiivisuus, pidentynyt puoliintumisaika, lisääntynyt stabiilius ja/tai vähentynyt immunogeenisuus.

Esillä olevan keksinnön mukaiset kalsitoniinit käsittävät ihmisen, lohen, ankeriaan, rotan, sian, naudan, lampaan ja kananpojan derivatisoidut kalsitoniinit. Lohen ja erityisesti ihmisen kalsitoniinit ovat edullisia. Kalsitoniinit voidaan johtaa luonnollisista, villityyppisistä molekyyleistä tai ne voidaan johtaa kalsitoniinin modifioiduista muodoista, joissa on biologista aktiivisuutta. Alalla tunnetaan erilaisia modifioituja kalsitoniineja mukaan lukien kalsitoniinit, joissa on aminohapposubstituutioita (esim. US-patentit 4 824 936, 4 764 589, 4 663 309 ja 4 658 014), deletioita (esim. US-patentit 4 820 804, 4 764 591, 4 639 511, 4 605 514 ja 4 537 716) ja kalsitoniinit, jotka sisältävät D-aminohapposubstituutioita (US-patentti 4 652 627). Termiä "biologisesti aktiivinen" käytetään tässä tarkoittamaan kalsitoniineja, joissa on luun resorptiota inhiboivaa aktiivisuutta. Hypokalseeminen aktiivisuus ja reseptorivälitteinen cAMP:n stimulointi ovat kalsitoniinien luun resorptiota inhiboivan aktiivisuuden indikaattoreita.

Esillä olevan keksinnön mukaisille molekyyleille on tunnusomaista derivatisoitu aminotermiinaali, joka on muodostettu yhdistämällä kalsitoniiniin syklinen, polysyklinen tai heterosyklinen osuus, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu substituoidusta tai substituomattomasta biaryylistä, joka sisältää optionaalisesti 1 tai 2 rengastyppiä atomia rengasta kohti, substituoidusta tai substituomattomasta heterosykloalkyylistä, joka sisältää 1 tai 2 rengasheteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä tai O:sta, substituoidusta tai substituomattomasta bis-heterosykloalkyylistä, joka sisältää 1 tai 2 heteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä ja O:sta, tai substituoidusta tai substituoi-

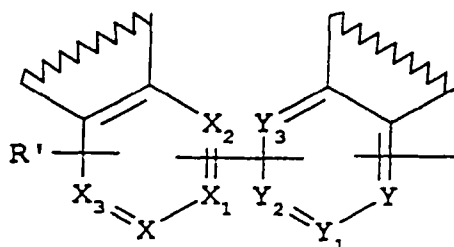
mattomasta heteroaryylistä, joka sisältää 1-4 heteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä ja O:sta, jolloin syklinen, polysyklinen tai heterosyklinen osuus on yhdistetty kalsitoniinin N-terminaaliseen kysteiniinitähteeseen amidikytköksen kautta. Täten esillä olevan keksinnön erään näkökohdan mukaan kalsitoniini reagoitetaan karboksyylihapon kanssa, jossa on jokin edellä kuvatuista osuuksista, N-terminaalisen derivatisoidun kalsitoniinin saamiseksi.

10

Termejä syklinen, polysyklinen, heterosyklinen, heterosykloalkyyli ja niiden ekvivalentteja käytetään tässä tarkoittamaan rengasrakenteita, joissa on kolme tai useampia atomeja rengasta kohti. Yleensä näissä rakenteissa on vähemmän kuin yhdeksän atomia rengasta kohti, edullisesti viisi, kuusi tai seitsemän atomia rengasta kohti, vaikkakin 12 tai useampia rengasatomeja sisältävää rakennetta voidaan käyttää. Termejä biaryyli, heteroaryyli ja niiden ekvivalentit käytetään tässä tarkoittamaan aromaattisia rengasrakenteita, joissa on viisi tai useampia atomeja rengasta kohti, edullisesti 5-8 rengasatomia, edullisemmin viisi tai kuusi rengasatomia rengasta kohti.

Esillä olevassa keksinnössä sykliset, polysykliset ja heterosykliset osuudet käsittävät fuusioituneet rengasrakenteet, jotka sisältävät 2-3 rengasta fuusioitunutta rengasryhmää kohti. Edulliset fuusioituneet rengasrakenteet käsittävät biaryyliosuudet, joissa on rakenne

30

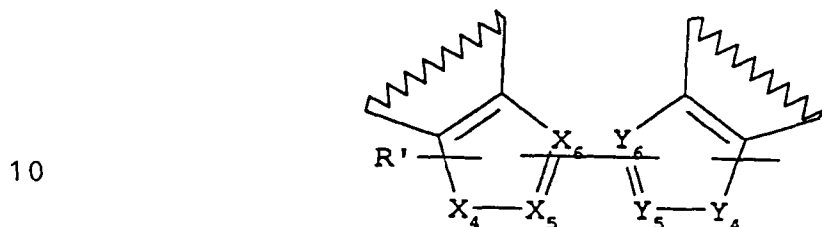


35

jossa X, X₁, X₂, X₃, Y, Y₁, Y₂ ja Y₃ ovat kukin erikseen C tai N ja R' on lineaarinen C₁-C₈-alkyyli, haaroittunut C₁-C₁₂-alkyyli, nitro, hydroksyyli, karboksyyli, trifluorime-

tyyli, karboksyyliamidi, sulfhydryyli, syano, halo, alkoksi, esteri tai H.

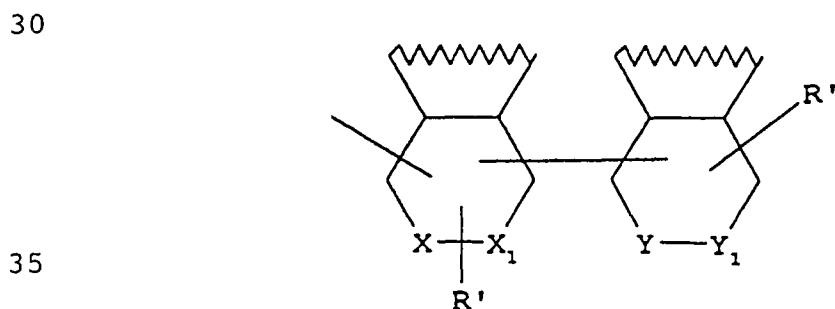
Toinen edullisten fuusioituneiden rengasrakenteiden ryhmä
5 käsittää rakenteen



jossa X^4 , Y^4 ovat kukin erikseen C, N, O tai S, X_5 , X_6 , Y_5
ja Y_6 ovat kukin erikseen C tai N sellaisten rajoitusten
15 kohteena, että kun X_4 on S tai O, X_5 :n täytyy olla C ja kun
 Y_4 on S tai O, Y_5 :n täytyy olla C ja R' edellä määritetty.
Kolmas edullisten fuusioituneiden rengasrakenteiden ryhmä
käsittää rakenteen



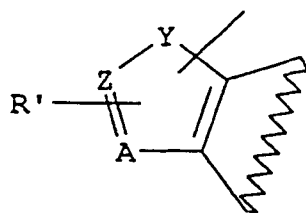
jossa X on N, O tai S, Y on C tai N, $n = 1$ tai 2, ja R'
edellä määritetty. Neljäs edullisten fuusioituneiden ren-
gasrakenteiden ryhmä käsittää bis-heterosykloalkyyliosuu-
det, joiden rakenne on



jossa X, X^1 , Y ja Y^1 ovat kukin erikseen N, O tai S ja R'
edellä määritetty. Viides edullisten fuusioituneiden ren-

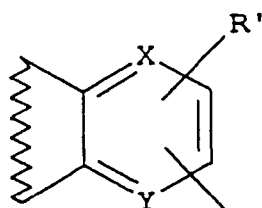
gasrakenteiden ryhmä käsittää heteroaryyliosuudet, joiden rakenne on

5



10 tai

15

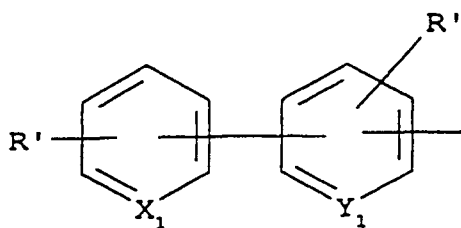


jossa X on C, O, S tai N, Y, Z ja A ovat kukin erikseen C tai N ja R' edellä määritetty.

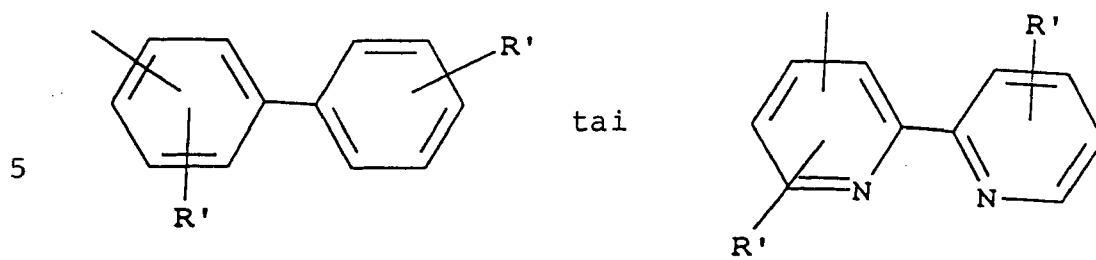
20

Kalsitoniini johdannaisten edullinen luokka käsittää ne, jotka on modifioitu lisäämällä yhdistettä, jonka kaava on

25



30 jossa X¹ ja Y¹ ovat kukin erikseen C tai N ja R' on lineaarinen C₁-C₈-alkyyli, haaroittunut C₁-C₁₂-alkyyli, nitro, hydroksyyli, trifluorimetyyli, karboksyyli, karboksyyliamidi, sulfhydryyli, syano, halo, alkoksi, esteri tai H. Eri-
tyyisen edulliset tämän luokan jäsenet käsittävät ne, jotka
35 on modifioitu lisäämällä yhdisteitä:



10 Toinen edullinen kalsitoniinijohdannaisten luokka käsittää ne, jotka on modifioitu lisäämällä yhdistettä, jonka kaava on:

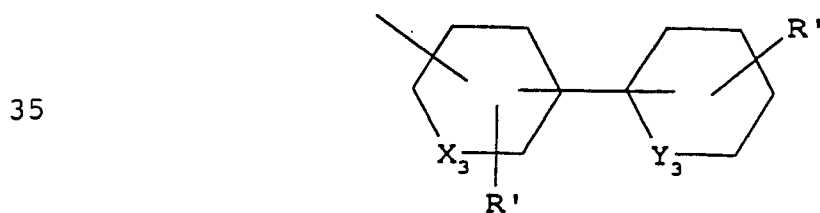


jossa $n = 1$ tai 2 , X_2 on N, O tai S, Y_2 on C tai N ja R' on edellä määritetty. Erityisen edulliset tämän luokan jäsenet käsittävät ne, jotka on modifioitu lisäämällä yhdistettä:

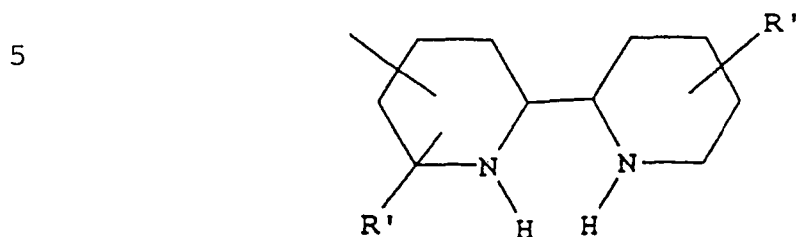
20



30 Kolmas edullinen kalsitoniinijohdannaisten luokka käsittää ne, jotka on modifioitu lisäämällä yhdistettä, jonka kaava on:



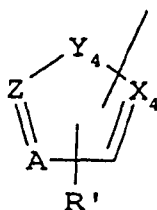
jossa X_3 ja Y_3 ovat kukin erikseen N, O tai S ja R' on edellä määritetty. Erityisen edulliset tämän luokan jäsenet käsittävät ne, jotka on modifioitu lisäämällä yhdistettä:



10

Neljäs edullinen kalsitoniini johdannaisten luokka käsittää ne, jotka on modifioitu lisäämällä yhdistettä, jonka kaava on:

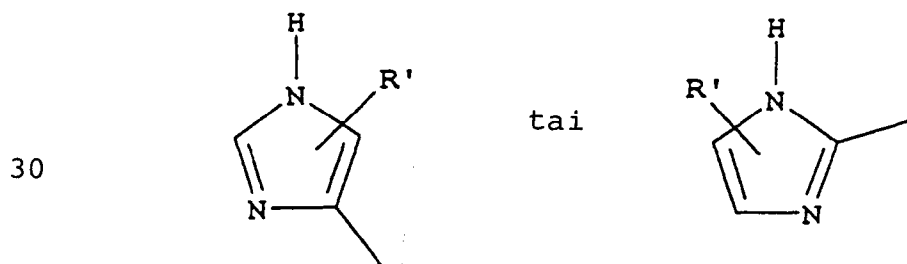
15



20

jossa Y_4 on O, S tai N, X_4 , Z ja A ovat kukin erikseen C tai N kohteena rajoituksella, että X_4 ei ole N, kun Y_4 on O tai S ja R' on edellä määritetty. Erityisen edulliset tämän luokan jäsenet käsittävät ne, jotka on modifioitu lisäämällä yhdistettä:

25

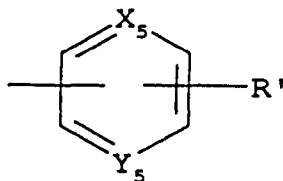


30

Viides edullinen kalsitoniini johdannaisten luokka käsittää ne, jotka on modifioitu lisäämällä yhdistettä, jonka kaava on:

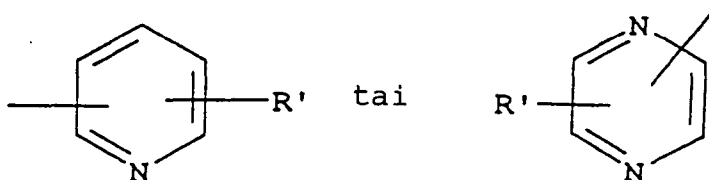
35

5



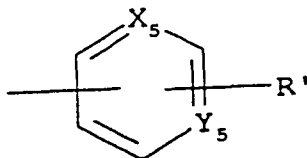
jossa X_5 on N, Y_5 on C tai N ja R' on edellä määritetty.
 Erityisen edulliset tämän luokan jäsenet käsittävät ne,
 10 jotka on modifioitu lisäämällä yhdisteitä:

15



Kuudes edullinen kalsitoniinijohdannaisten luokka käsittää
 ne, jotka on modifioitu lisäämällä yhdistettä, jonka kaava
 20 on:

25



30

jossa X_5 on N, Y_5 on C tai N ja R' on edellä määritetty.
 Edellä kuvatuista yhdisteistä ovat edullisia ne, joissa R'
 on CO_2H tai H.

Esillä olevan keksinnön mukaiset kalsitoniinijohdannaiset
 voidaan syntetoida kiintofaasi- tai liuosfaasimenetelmillä,
 joita käytetään konventionaalisesti peptidien syntetointiin
 (katso esimerkiksi Merrifield, R.B. J. Amer. Chem. Soc. 85:
 35 2149-2154, 1963, Birr, C. Aspects of the Merrifield Peptide
 Synthesis, Springer-Verlag-Heidelberg, 1978, Carpino, L.A.
 Acc. Chem. Res. 6:191-198, 1973, Kent S. B. Ann. Rev. Bio-
 chem. 57:957-989, 1988, Gregg et al. Int. J. Peptide Pro-
 tein. Res. 35:161-214, 1990, The Peptides, Analysis, Syn-

thesis, Biology, Vol. 1, 2, 3, 5: Gross, E ja Meinhofer, J. toim., Acad Press, New York, 1979, ja Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2. painos, Pierce Chem. Co., Rockford, Il, 1984, jotka sisällytetään tähän viitteeksi kokonaisuudessaan.) Kiintofaasimenetelmän käyttö on edullista. Lyhyesti sanoen N-suojattu C-terminaalinen aminohappotähdde kytketään liukenemattomaan kantoaineeseen, kuten divinyylibentseeniristikytkettyyn polystyreeniin, polyakryyliamidihartsiin, piimaa/polyamidiin (pepsyn K), säädettyyn huokoslasiin, selluloosaan, polypropyleenikalvoihin, akryylihapolla päällystettyihin polyetyleenisauvoihin ja niiden kaltaisiin. Suojattujen aminohappojohdannaisien peräkkäisiä suojauksenpoisto-, neutralointi- (BOC-kemian tapauksessa, vide infra) ja kytkentäjaksoja käytetään aminohappojen kytkemiseen C-terminaalista aminohapposekvenssin mukaisesti. Edullisia kiinteitä kantoaineita ovat divinyylibentseeniristikytketyt polystyreenihartsit, joita on saatavissa kaupallisesti erilaisina funktionalisoituina muotoina mukaan lukien kloorimetyylihartsi, hydroksimetyylihartsi, para-asetamidometyylihartsi, bentshydryyliamiini (BHA)hartsi, p-metyyllibentshydryyliamiini (MBHA)hartsi, oksiimihartsit, 4-alkoksibentsyylialkoholihartsi, 4-(2',4'-dimetoksifenyyliaminometyyli)-fenoksimetyylihartsi, 2,4-dimetoksibentshydryyliamiinihartsi ja 4-(2',4'-dimetoksifenyyli-FMOC-aminometyyli)-fenoksiasetamidonorleusyyli-MBHA-hartsi (Rink-amidi-MBHA-hartsi). BHA, MBHA ja Rink-amidi-MBHA-hartsit ovat erityisen edullisia, koska ne saavat suoraan aikaan C-terminaalisia amideja peptidiketjun hartseista pilkkomisen jälkeen. Erityisen edullinen esillä olevassa keksinnössä käytettäväksi on Rink-amidi-MBHA-hartsi (saatavissa Nova Biochemistä, La Jollasta, Kaliforniasta). Aminohappojen alfa-aminoryhmän edullinen suojaryhmä on happolabiili t-butyylisikarboneyli (BOC). BOC:n suojaus poistetaan käyttämällä trifluorietikkahappoa (TFA) sopivassa liuottimessa, kuten metyleenikloridissa. Saatu TFA-suola neutraloidaan emäksellä, kuten di-isopropyylietyyliamiinilla (DIEA) tai trietyyliamiinilla (Et₃N). Sitteen siihen kytketään suojattu aminohappojohdannainen. Toisen edullinen alfa-aminohappojen suojaryhmä on emäslabiili

9-fluorenyylimetoksykarbonyyli (Fmoc). Amino happojen sivuketjujen funktionaalisuuksien sopivat suojaryhmät, jotka ovat kemiallisesti yhteensopivia BOC- ja Fmoc-ryhmien kanssa, ovat alalla hyvin tunnettuja. Käytettäessä Fmoc-kemialla ovat seuraavat suojatut aminohappojohdannaiset edullisia: Fmoc-Cys(Trit), Fmoc-Ser(But), Fmoc-Asn(Trit), Fmoc-Leu, Fmoc-Thr(Trit), Fmoc-Val, Fmoc-Leu, Fmoc-Gly, Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Gln(Trit), Fmoc-Glu(Obut), Fmoc-His(Trit), Fmoc-Tyr(But), Fmoc-Arg(PMC) ja Fmoc-Pro. Aminohappotähteet voidaan kytkeä käyttämällä erilaisia alalla tunnettuja kytkentäaineita ja -kemioita, kuten suoraa kytkemistä DIC:n, DCC:n tai BOP:n kanssa; ennalta muodostettujen symmetristen anhydridien kautta; aktiivisten esterien, kuten pentafluorifenyyliesterien, kautta; tai ennalta muodostettujen HOBt-aktiivisten esterien kautta. HBTU:lla ([2-(1H-bentsotriatsol-1-yyli,1,1,3,3-tetrametyyliuroniumheksafluorifosfaatti)] aktivointi hydroksibentsotriatsolin (HOBt) läsnäollessa on edullista.

Kiintofaasimenetelmä voidaan suorittaa käsin, vaikkakin automatisoitu synteesi kaupallisesti saatavalla peptidisyntetisaattorilla (esim. Applied Biosystems 413A tai sen kaltainen) on edullinen. Tyypillisessä synteesissä Fmoc-Rink-amidi-MBHA-hartsia käsitellään 20 %:lla piperidiiniä NMP:ssä Fmoc-ryhmän poistamiseksi. Hartsin pesemisen NMP:llä jälkeen ensimmäinen aminohappo (C-terminaalinen Fmoc-Pro) panostetaan hartsille käyttäen HBTU/HOBt-menetelmää. ABI FastMoc-protokollien (ABI-käyttäjä bulletiinit 32 ja 33, Applied Biosystems, Inc.) mukaisia peräkkäisiä suojauksenpoisto- (20 % piperidiini/NMP:llä) ja kytkentäjaksoja käytetään kokonaisen peptidisekvenssin rakentamiseen.

Ennen N-terminaalisen modifiointiryhmän kiinnittämistä vahvistetaan peptidin identiteetti ja integriteetti esimerkiksi poistamalla suojaus ja pilkkomalla Fmoc-peptidihartsin pieni osa Reagent K:lla (0,75 g kiteistä fenolia, 0,25 ml etaaniditiolia, 0,5 ml tioanisolia, 0,5 ml deionisoitua vettä, 10 ml TF) tai sen kaltaisella. Peptidi saostetaan ja pestään eetterillä, puhdistetaan käänteisfaasi-HPLC:llä

ja karakterisoidaan aminohappoanalyysillä ja massaspektroskopialla.

Sitten kalsitoniinin aminotermiinaali derivatisoidaan. Käytettäessä FMOC-kemialla peptidihartsin N-terminaalista FMOC-ryhmästä poistetaan tavallisesti suojaus 20 %:lla piperidiiniä DMF:ssä 20-30 minuuttia. Hartsi suodatetaan, pestään kauttaaltaan DMF:llä ja DCM:llä ja kuivataan. N-terminaaliseen modifiointiin (R-ryhmien sisäänviemiseen) käytettävät karboksyylijohtannaiset voidaan kytkeä hartsikytketyn peptidin N-terminaaliseen aminoryhmään samoilla aktivointimenetelmillä kuin mitä käytetään peptidien syntetoinnissa, kuten karbodi-imidivälitteisellä kytkennällä, seka-anhydridillä, symmetrisellä anhydridillä, ennalta muodostetulla aktiivisella esterillä, asyylikloridilla, BOP-, PyBOP- tai PyBrOP-välitteisellä kytkennällä HOBt:n kanssa tai ilman sitä, tai niiden alalla tunnetuilla variaatioilla ja parannuksilla (katso esimerkiksi Coste et al., Tetrahedron Lett. 31: 669, 1990 ja Coste et al., Tetrahedron Lett. 31: 205, 1990). Kytkentä voidaan tehdä käsin tai automatisoiduilla välineillä. Erityisen edullinen menetelmä on esiaktivoida ensin karboksyylihapojohdannainen reagoittamalla se HOBt:n ja DIC:n kanssa DCM:n ja DMF:n seoksessa huoneenlämpötilassa karboksyylihapojohdannaisen HOBt-esterin muodostamiseksi. Sitten seos lisätään peptidihartsiin, josta suojaus on poistettu, ja suspensiota ravistetaan huoneenlämpötilassa. Reaktion jälkeen tehdään Kaiser-testi. Sitten hartsi suodatetaan, pestään DMF:llä ja DCM:llä ja kuivataan.

Derivatisoitu peptidi pilkotaan hartsista ja siitä poistetaan suojaus käsittelmällä TFA:lla, joka sisältää sopivia puhdistavia lisäaineita. Voidaan käyttää monia tällaisia pilkontareagensseja, kuten Reagent K:ta ja muita. Modifioitu peptidi erotetaan hartsista suodattamalla ja eristetään eetterisaostuksella. Lisäpuhdistaminen voidaan suorittaa konventionaalisilla menetelmillä, kuten geelisuodatus ja käänteisfaasi-HPLC.

Kalsitoniinin asemassa 1 ja 7 olevien kahden kysteiinin välinen disulfididisidos muodostetaan konventionaalisten menetelmien mukaisesti, kuten ilmahapetuksella tai kaliumferri-
 5 syyanidilla tai DMSO:lla hapettamalla (Tam et al. J. Am. Chem. Soc. 113: 6657-6662, 1991). Erityisen edullinen menetelmä on DMSO:lla hapettaminen. Sen jälkeen kun hapetusreaktio on päättynyt HPLC:llä tai Ellmanin reagenssilla tarkkailtuna, peptidi eristetään ja puhdistetaan HPLC:llä ja sen puhtaus analysoidaan analyytisellä HPLC:llä ja mas-
 10 saspektrometrialalla.

Eräänä keksinnön kohteena saadaan aikaan multimeerisiä kalsitoniineja. Heterosykloalkyyli- tai heteroaryyliryhmällä derivatisoituun kalsitoniiniin yhdistetään siirtymämetallin
 15 ioni kompleksin muodostamiseksi. Tässä suhteessa edullisia kalsitoniinijohdannaisia ovat ne, jotka on modifioitu lisäämällä kaksi ketjutyyppiä sisältävää lineaarista bisyklistä osuutta, kuten bipyridiini- tai bipyridiinin kaltaisen osuus. Esimerkiksi dikarboksi-bipyridiinillä deri-
 20 vatisoitu lohen kalsitoniini muodostaa Fe^{2+} :n kanssa 3:1-moolisen kompleksin. Muut tässä suhteessa käyttökelpoiset metallit käsittävät Cr^{3+} :n, Fe^{3+} :n, Mn^{2+} :n, Co^{2+} :n, Ni^{2+} :n, Cu^{2+} :n, Cu^{2+} :n ja Zn^{2+} :n. Edullinen menetelmä kompleksien valmistamiseksi on modifioitujen kalsitoniinien titraaminen
 25 sopivan metallisuolan vesiliuoksella.

Esillä olevan keksinnön mukaiset kalsitoniinijohdannaiset voivat olla farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen, erityisesti happoadditiosuolojen sekä orgaanisten happojen ja
 30 mineraalihappojen suolojen, muodossa. Esimerkit tällaisista suoloista käsittävät orgaanisten happojen, kuten muurahais-hapon, etikkahapon, propionihapon, glykolihapon, maitohapon, palorypälehapon, oksaalihapon, meripihkahapon, omenahapon, rypälehapon, sitruunahapon, bentsoehapon, salisyyli-
 35 hapon ja niiden kaltaisten, suolat. Emäksisten aminohappotähteiden happoadditiosuolat valmistetaan käsittelemällä peptidi sopivalla hapolla tai mineraalilla alan ammattimiehen hyvin tuntemilla menetelmillä tai haluttu suola voidaan saada suoraan lyofilisoimalla sopivasta haposta pois.

Esillä olevan keksinnön mukaisissa yhdisteissä on hypokalseemista aktiivisuutta ja ne ovat käyttökelpoisia ihmis- ja eläinlääketieteessä seerumin kalsiumin vähentämiseen ja luun metabolismin säätämiseen. Esillä olevan keksinnön mukaisia yhdisteitä voidaan käyttää esimerkiksi osteoporoosin, Pagetin sairauden, lisäkilpirauhasen liikatoiminnan, luunpehmenistaudin, pikkulasten itsesyntyisen liikakalsiumverisyyden ja muiden tilojen hoidossa. Kalsitoniinijohdannaisia voidaan myös käyttää mahaerityksen inhibointiin hoidettaessa akuuttia haimatulehdusta ja maha-suolisairauksia.

Farmaseuttiset koostumukset annetaan päivästä viikkoon välein. "Tehokas määrä" tällaista farmaseuttista koostumusta on määrä, joka saa aikaan seerumin kalsiumin kliinisesti merkittävän vähenemisen, luun resorption inhibition, mahaerityksen inhibition tai muun vaikutuksen. Tällaiset määrät riippuvat osittain hoidettavan potilaan erityisestä tilasta, iästä, painosta ja yleisestä terveydestä ja muista alan ammattimiehelle ilmeisistä tekijöistä. Kalsitoniinijohdannaisen terapeuttisesti tehokkaiden annosten konsentraatio voi vaihdella laajalti riippuen indikaatiosta ja ne ovat alalla hyvin tunnettuja. Esimerkiksi osteoporoosin hoitoon tarkoitetut terapeuttiset annokset ovat tavallisesti alueella 50-110 kansainvälistä yksikköä (International Units, I.U.). Teho arvioidaan vertaamalla hypokalseemista vaikutusta rotissa standardivalmisteen tehoon ja se ilmaistaan kansainvälisinä yksikköinä International Reference of Preparationissa, jota toimittaa national Institute for Biological Standards and Control, Holly Hill, Lontoo, kuvatusti. Yhdisteistä, joiden puoliintumisikä on parantunut merkittävästi, voidaan antaa pienempinä annoksina.

Kalsitoniinijohdannaiset ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat formuloidaan parenteraaliseen, oraaliseen, nasaaliseen, rektaaliseen tai transdermaaliseen antamiseen tarkoitetun farmaseuttisesti hyväksyttävän kantoaineen kanssa konventionaalisten menetelmien mukaisesti. Formuloinnit voivat sisältää lisäksi yhtä tai useampaa laimenninta, täyteainetta, emulgointiainetta, säilöntäainetta,

puskuria, täyteainetta jne ja ne voidaan tehdä sellaisiin muotoihin nesteinä, jauheina, emulsioina, peräpuikkoina, liposomeina, ihon läpi päästävinä laastareina, tabletteina jne. Alan ammattimies voi formuloida esillä olevan keksinnön mukaisia yhdisteitä sopivalla tavalla ja hyväksytyjen käytäntöjen mukaisesti, kuten niiden käytäntöjen mukaan, jotka on selostettu Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, toim., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990 (joka sisällytetään tähän kokonaisuudessaan viitteeksi).

10

Seuraavat esimerkit valaisevat keksintöä eivätkä rajoita sitä.

Esimerkki 1

15 A. Lohen kalsitoniinin synteesi

Lineaarinen suojattu lohen kalsitoniini (SCT) syntetetoitiin kiintofaasimenetelmällä Applied Biosystems, Inc.:n (Foster City, CA) 431A-peptidisyntetisoijalla käyttäen FMOC-kemialla ja HOBt- ja HBTU-aktivointimenetelmää. Käytettiin Rink-ami-
 20 di-MBHA-hartsia (Nova Biochem, La Jolla, CA), jossa on 0,43 nM:n substituo (580 mg). Kaikki kytkennät olivat > 98,5 %. Synteesin lopussa hartsi pestiin kauttaaltaan NMP:llä ja CH₂Cl₂:lla ja kuivattiin. Pienestä osaa (27 mg) hartsi-
 25 kytkettyä FMOC-SCT:tä poistettiin suojaus ja se pilkottiin 10 ml:aan reagenssi K:ta 2,5 tunniksi. Hartsi suodatettiin ja liuos haihdutettiin. Jäännös kromatografoitiin Vydac C.4- (2,2 x 25 cm) HPLC-pylväessä käyttäen 0-60 % B:n gradienttia 40 minuuttia (liuotin A: 0,1 % TFA vedessä ja liuotin B: 0,1 TFA asetonitriilissä) puhtaan FMOC-SCT:n saami-
 30 seksi. Peptidin retentioaika oli 36,38 min. Peptidi karakterisoitiin aminohappoanalyysillä ja massaspektrometrialalla (ms 3656,33) lohen kalsitoniiniin hartsiin kytköksen integriteetin toteamiseksi.

35 B. Bipyridiinillä modifioidun kalsitoniinin (ZP-1 tai BP_{4,4}.CT) valmistaminen

2,2'-bipyridiini-4,4'-dikarboksyyliliappoa (0,2 mM) liuotettiin 3 ml:aan 5-%:ista di-isopropylietyleeniamiinia (DIEA) CH₂Cl₂:ssa pulloon, joka on varustettu sekoitustangolla ja

kuivausputkella. N-hydroksibentsotriatsolia (HOBt) (0,5 mM) ja di-isopropyylikarbodi-imidiä (DIC) (0,5 mM) lisättiin HOBt-diesterin muodostamiseksi, 45 minuutin sekoittamisen jälkeen liuos kirkastui ja muuttui heikon keltaiseksi. SCT-hartsia (100 mg) käsiteltiin 20-%:isella piperidiinillä DMF:ssä N-terminaalisen suojaryhmän poistamiseksi. SCT-harts, jos suojaus oli poistettu, lisättiin 2,2'-bipyridiinikarboksyylihappo-HOBt-diesteriin. Seosta pidettiin ravistuksessa yön ajan. Neljän NH₂-ryhmän negatiivinen Kaiser-testi osoitti, että kytkeytyminen oli täydellinen. SCT-harts pestiin DMF:llä ja CH₂Cl₂:lla.

Bipyridiinillä modifioidun SCT:n pelkistynyt muoto pilkottiin hartsista reagenssilla K ja puhdistettiin käänteisfaasi HPLC:llä. Asetonitriilin ja veden seosta, joka sisältää 0,1 % trifluorietikkahappoa, käytettiin HPLC-liuottimena. Lineaarista gradienttia (20 CH₃CN/vesi 80 %:iin CH₃CN/vettä 20 minuutissa) käytettiin peptidin eluoimiseen. Päähuippu kerättiin ja lyofilisoitiin. Saatu peptidi hapetettiin liuottamalla ensin peptidi 1-%:iseen ammoniumbikarbonaatin vesiliuokseen, joka sisältää 14 % DMSO peptidikonsentraatiossa 5 mg/ml. Sen jälkeen kun seosta oli pidetty yön ajan huoneenlämpötilassa, tuote eristettiin ja puhdistettiin käänteisfaasi-HPLC:llä. Saanto oli 15 mg. Puhdistettu peptidi karakterisoitiin käyttämällä massaspektroskopiaa ja AAA:ta. FAB-MS tuotti m/e = 3660 (MH⁺). AAA tuotti Asx 2,20 (2), Glx 3,43 (3), Ser 4,16 (4), Gly 3,38 (3), His 0,98 (1), Arg 1,19 (1), Thr, 4,96 (5), Pro 2,24 (2), Tyr 1,21 (1), Val 1,00 (1), Cys 0,86 (2), Leu 4,54 (5), Lys 2,22 (2).

Kiertodikroismispektroskopiaa käytettiin kalsitoniinijohdannaisten ja niiden Fe(II)-kompleksien konformaation tutkimiseen vesipuskuriliuoksessa. Bipyridiinillä modifioitujen kalsitoniinien näennäismolekyyllipaino määritettiin geelisuodatuksella ja sedimentaatiotasapainotuskokeilla Fe(II):n läsnäollessa ja puuttuessa. Trimeeristen kalsitoniini-Fe(II)-kompleksien muodostumisvakiot ja dissosiaatiomäärät määritettiin UV-spektroskopialla.

C. Nikotiinihapolla modifioidun kalsitoniinin (ZP-5 tai Nic-SCT) valmistaminen

Nikotiinihappoa ($3,7 \times 10^{-5}$ moolia) liuotettiin muutamaan tippaan DMF:ää. DIC:tä ($3,7 \times 10^{-5}$ moolia) lisättiin sit-
 5 ten. Seosta ravistettiin huoneenlämpötilassa suunnilleen kymmenen minuuttia, minkä jälkeen lisättiin SCT-hartsia, josta suojaus on poistettu. Sitten tehtiin kytkentäreaktio käyttämällä Kaiser-testiä. Suspensiota ravistettiin yön ajan.

10

Nic-SCT pilkottiin hartsista sekoittamalla reagenssiin K (1,65 ml TFA, 0,112 ml 88-%:ista fenolia, 0,098 ml H₂O:ta, 0,1 ml tioanisolia, 0,05 ml etaaniditiolia) Nic-SCT-hart-
 15 sia. Reaktioseosta ravistettiin huoneenlämpötilassa 2,5 tuntia ja sitten seos suodatettiin hartsin poistamiseksi. Peptidi saostettiin kylmässä eetterissä ja kerättiin sentrifugoimalla. Sakka pestiin eetterillä kolme kertaa ja sitä kuivattiin kuivaimessa suunnilleen yksi tunti. Kuivattu peptidi liuotettiin 0,5 ml:aan H₂O:ta ja sitten se levitet-
 20 tiin Sephadex G-15 -pylvääseen. Pylvästä eluoiitiin 5-%:i- sella etikkahapolla. Peptidi havaittiin absorbanssilla 270 nm:ssä. Peptidiä sisältävät fraktiot yhdistettiin ja lyofi- lisoitiin.

25 Nic-SCT analysoitiin käänteisfaasi-HPLC:llä käyttäen C₄- analyyttistä pylvästä (Vydac, Hesperia, CA). HPLC:tä tark- kailtiin 270 nm:ssä. Eluantti oli asetonitriili ja vesi, joka sisälsi 1 % TFA. Lineaarista gradienttia, 20 % - 80 % asetonitriiliä 20 minuutissa, käytettiin Nic-SCT:n eluoi-
 30 miseen. Päähuippu (55 % asetonitriiliä) kerättiin ja lyo- filisoitiin. Peptidin kokonaismäärä oli suunnilleen 18 mg.

Nic-SCT (18 mg) hapetettiin DMSO:lla molekyylinsisäisen disulfidiseoksen muodostamiseksi. Pelkistyneen katoamista
 35 Nic-SCT:stä seurattiin Ellmanin reagenssilla. Alkukonsen- traatio oli 2 mg/ml puskuriliuoksessa (2 % NH₄HCO₃, pH 8,0), joka sisälsi 10 % DMSO. Seosta sekoitettiin yön ajan. Hapettuneen Nic-SCT:n HPLC:ssä oli yksi huippu ja retentio-

aika (59 % asetonitriiliä) oli pidempi kuin pelkistyneen muodon (55 % asetonitriiliä) retentioaika. Hapettuneen Nic-SCT:n havaittiin olevan > 95-%:isesti puhdasta HPLC:hen perustuen. Puhtaan peptidin kokonaismäärä oli 17 mg.

5

D. Pykolinyylillä modifioidun kalsitoniinin (ZP-6 tai Pic-SCT) valmistaminen

Pic-SCT syntetoitiin menetelmällä, joka on samanlainen kuin Nic-SCT:n yhteydessä kuvattu. Pikoliinihappoa ($3,7 \times 10^{-5}$ moolia) kytkettiin SCT-hartsiin, josta suojaus oli poistettu (100 mg), edellä kuvatusti. Pic-SCT:stä poistettiin suojaus ja se pilkottiin hartsista käyttäen reagenssia K edellä kuvatusti. Pic-SCT puhdistettiin HPLC:llä käyttäen lineaarista gradienttia 20 % - 80 % asetonitriiliä 20 minuutissa. Päähuippu (60 % asetonitriiliä) kerättiin ja lyofilisoitiin. Peptidin kokonaismäärä oli suunnilleen 20 mg. Sitten puhdistettu Pic-SCT hapetettiin, kuten yleisesti kuvattiin Nic-SCT:n yhteydessä. Hapetetun muodon HPLC:ssä oli yksittäinen huippu ja retentioaika (61 % asetonitriiliä) oli melkein sama kuin pelkistetyn muodon retentioaika. Hapettuneen Pic-SCT:n havaittiin olevan 90-%:isesti puhdasta HPLC:hen perustuen (17 mg). Pic-SCT puhdistettiin edelleen lisää-HPLC-ajoilla.

25 E. 2-pyratsinoyylillä modifioidun kalsitoniinin (ZP-7 tai 2-Pyr-SECT) valmistaminen

2-Pyr-SCT syntetoitiin menetelmällä, joka on samanlainen kuin Nic-SCT:n yhteydessä kuvattu. 2-pyranitsiinikarboksyylihappo ($3,7 \times 10^{-5}$ moolia) kytkettiin SCT-hartsiin, josta suojaus oli poistettu (100 mg), edellä kuvatusti. 2-Pyr-SCT:stä poistettiin suojaus ja se pilkottiin hartsista käyttäen reagenssia K edellä kuvatusti. 2-Pyr-SCT puhdistettiin HPLC:llä käyttäen lineaarista gradienttia 20 %-80 % asetonitriiliä 20 minuutissa. Päähuippu (59 % asetonitriiliä) kerättiin ja lyofilisoitiin. Peptidin kokonaismäärä oli suunnilleen 20 mg. Sitten puhdistettu 2-Pyr-SCT hapetettiin, kuten yleisesti kuvattiin Nic-SCT:n yhteydessä. Hapetetun muodon HPLC:ssä oli yksittäinen huippu ja

retentioaika (61 % asetoniitriiliä) oli hieman pidempi kuin pelkistetyn muodon retentioaika. Hapettuneen 2-Pyr-SCT:n havaittiin olevan > 90-%:isesti puhdasta HPLC:hen perustuen (18 mg).

5

F. Muiden modifioitujen kalsitoniinien valmistaminen

2,2'-bipyridiini-5,5'-dikarboksylihapolla (ZP-2 tai BP_{5,5}-SCT), 4-4'-bifenyyliidikarboksylihapolla (ZP-3 tai BPhe-SCT), isonipekotiinihapolla (ZP-8 tai isonip-SCT), DL-pipecoliinihapolla (ZP-9 tai pip-SCT) ja nipekotiinihapolla (ZP-10 tai nip-SCT) modifioidut lohen kalsitoniinit syntetitiin menetelmillä, jotka ovat oleellisesti samat kuin Nic-SCT:n yhteydessä kuvataan. Yhdisteet puhdistettiin HPLC:llä edellä kuvastusti ja testattiin jäljempänä kuvastusti.

15

Esimerkki 2

BP_{4,4}-CT:n karakterisointi: Kyky sitoutua kalsitoniinireseptoriin

20 Derivatisoidun BP_{4,4}-CT-molekyylin kyky sitoutua kalsitoniinireseptoriin testattiin mittamaalla molekyylin kyky nostaa syklisen AMP:n tasoja nisäkässoluissa ilmentäen joko rekombinanttinen ihmisen kalsitoniinireseptori tai endogeeninen hamsterin kalsitoniinireseptori.

25

Ihmisen kalsitoniinireseptori valmistettiin seuraavasti: Plasmidia, joka nimettiin pHOLLEXiksi (talletettu E. coli-kantana XL-1 -sininen transformantti American Type Culture Collectioniin (12301 Parklawn Dr., Rockville, Md) 1. syyskuuta, 1992 talletusnumerolla 60067) ja joka sisältää DNA-rakenteen, joka kykenee ohjaamaan ihmisen kalsitoniinireseptorin ilmentymistä, käytettiin solulinjan BHK/KZ10-20-48 (selostettu US-patenttihakemuksessa nro 07/954 804, joka sisällytetään tähän viitteeksi kokonaisuudessaan) transfektoimiseen. BHK/KZ10-20-48 on BHK-solulinja, joka on transfektoitu plasmidilla, joka sisältää lusiferaasigeenin, jonka ilmentyminen riippuu syklisen AMP:n vaste-elementistä (CRE, joka indusoi myötävirtaan koodaavien sekvenssien ilmentymistä syklisen AMP:n läsnäollessa). Täten syklisen

30

35

AMP-reitin stimulointi esimerkiksi sitomalla ligandi kalsitoniinireseptoriin saa aikaan lusiferaasigeenin ilmentymisen. Vektoria, jossa ei ole kalsitoniinireseptoria, käytettiin solulinjan BHK/KZ10-20-48 transfektoimiseen negatiivista verrokkia varten. Transfektantteja viljeltiin selektiivisessä viljelyväliaineessa (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), jossa on 5 % seerumia), joka sisältää sekä 500 µg/ml G418-neomysiiniä että 250 nM metotreksaattia.

10

Endogeenistä hamsterin kalsitoniinireseptoria ilmentävä BHK-solulinja transfektoitiin plasmidilla KZ10-20-48 edellä kuvatun CRE-indusoitavan lusiferaasireseptorin aikaansaamiseksi. Transfektoituja soluja viljeltiin valikoivassa viljelyväliaineessa, joka sisältää sekä 500 µg/ml G418-neomysiiniä että 250 nM metotreksaattia.

Kalsitoniinireseptoria ilmentävät solut testattiin triplikaattina CRE:hen kytkeytyvän lusiferaasin vasteen lohen kalsitoniiniin (SCT) ja derivatisoituihin kalsitoniineihin osalta konsentraatioissa 10^{-12} – 10^{-6} M. Tasapohjaiset MICROLITE-pullot valmistettiin siten, että jokainen kolo sisälsi 2×10^4 solua 100 µl:ssa valikointiväliainetta ja soluja viljeltiin yön ajan. SCT ja GF43 valmistettiin 2×10^4 solunäytteenä triplikaattikoloissa 10^{-12} – 10^{-6} M:sa saamiseksi viljelyväliaineessa. Induktio saatettiin alkuun poistamalla vanha väliaine koloista ja lisäämällä 100 µl tuoretta viljelyväliainetta ja 100 µl jompaakumpaa 2X liuosta triplikaattinäyttekoloihin. Indusoitumattomat lusiferaasitasot määritettiin triplikaattikoloista, joihin lisättiin 100 µl DMEM, joka sisältää 10-%:ista fetaalisen naudan seerumia. Levyjä inkuboitiin neljä tuntia 37 °C:ssa, 5 % CO₂, lusiferaasin induktion sallimiseksi. Induktion jälkeen väliaineet poistettiin ja kolot pestiin kerran 200 µl:lla PBS:ää koloa kohti. Pesun jälkeen jokaiseen koloon lisättiin 20 µl varastossa olevan Cell Culture Lysis Reagentin (Lusiferase Assay System, Promega Corp., Madison, WI) 1:5-laimennosta (steriilissä vedessä) ja levyjä inkuboitiin 15 minuuttia huoneenlämpötilassa. Levyt siirrettiin Labsystems

Luminoskan -mikrotiitteriluminometriin (Labsystems Inc., Morton Grove, IL), johon lisättiin 40 µl Luciferase Assay Substratea (Luciferase Assay System, Promega), reaktiota sekoitettiin kolme sekuntia ja lusiferaasisignaali integroitiin kahdeksi sekunniksi koloa kohti. Kunkin yhdisteen lusiferaasin taittoinduktio laskettiin seuraavasti:

$$\text{Taittoinduktio} = \frac{\text{Indusoitu signaali} - \text{Indusoimaton signaali}}{\text{Indusoimaton signaali}}$$

10

Testien tulokset on annettu taulukossa 1.

Taulukko

15	Hamsteri-CT-reseptori	HCT	ZP-1	ZP-2	ZP-3	ZP-5	ZP-6	ZP-7	ZP-8	ZP-9	ZP-10
		5,9	73	125	341	71	98	155	106	147	152
20	% SCT EC50	X 10 ³									
	Ihmisen CT-reseptori	HCT	ZP-1	ZP-2	ZP-3	ZP-5	ZP-6	ZP-7	ZP-8	ZP-9	ZP-10
25	% SCT EC50	345	97	199	450	112	140	158	146	230	243

Nämä tiedot osoittavat, että derivatisoiduilla kalsitonineilla ZP-1, ZP-2, ZP-5, ZP-6, ZP-7, ZP-8, ZP-9 ja ZP-10 on EC50 (puolimaksimaalinen aktiivisuus) samanlainen kuin lohen kalsitoniinilla ja suurempi aktiivisuus kuin ihmisen kalsitoniililla. ZP-3:n teho on samanlainen kuin ihmisen kalsitoniinin.

Esimerkki 3

BP-CT:n vaikutukset in vivo seerumin kalsiumtasoihin

10 Bipyridiini-kalsitoniinin biologinen aktiivisuus in vivo mitattiin BP_{4,4}-CT:n kykynä alentaa hiirten seerumin kalsiumia verrattuna lohen kalsitoniinin vaikutukseen. Kuusi viikkoa vanhoille urospuolisille Swiss-Webster-hiirille (12-18 grammaa) annettiin yksittäisiä, ihonalaisia injektioita BP_{4,4}:ää, lohen kalsitoniinia tai välitysainetta.

Verinäytteet seerumin kalsimin mittaamista varten kerättiin orbitaalisista sinuspunktioista aikaväleinä 0, 1 ja 4 tuntia injektoinnin jälkeen. Seerumin kalsium analysoitiin käyttämällä Dacos Excel Analyzeriä (Coulter Electronics Company, Hialeh, Fla). Yhdisteitä annettiin seuraavina annoksina kahdeksan hiiren ollessa siirretty umpimähkäisesti kukin seuraavaan ryhmään:

	Ryhmä nro	Annos
10	1 välityksine	0,9-%:inen suolaliuos
	2 BP-CT	100 ng/ml
	3 BP-CT	1 µg/ml
	4 BP-CT	10 µg/ml
	5 SCT	100 ng/ml
15	6 SCT	1 µg/ml
	7 SCT	10 µg/ml

Kuviot 1, 2 ja 3 osoittavat, että ekvivalenttiset määrät BP_{4,4}-CT:tä ja lohen kalsitoniinia vähentävät yhtäläisesti seerumin kalsiumtasoa annoksesta riippuvalla tavalla.

Vaikka keksinnön joitakin suoritusmuotoja on kuvattu yksityiskohtaisesti selventämissyistä, alan ammattimiehestä on selvää, että tässä kuvattuja koostumuksia ja menetelmiä voidaan modifioida poikkeamatta keksinnän hengestä ja piiristä. Näin ollen keksintö rajoittuu ainoastaan oheisiin patenttivaatimuksiin.

SEKVENSSILUETTELO

(1) YLEISTÄ TIETOA:

- 5 (i) HAKIJA: ZymoGenetics, Inc.
4225 Roosevelt Way N.E.
Seattle
WA
US
10 98105

University of Washington
Seattle
WA
15 US
98105
- (ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Derivatisoidut kalsitoniinit
(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 2
20 (iv) KIRJEENVAIHTO-OSOITE:
(a) VASTAANOTTAJA: ZymoGenetics, Inc.
(b) OSOITE: 4225 Roosevelt Way, N.E.
(c) KAUPUNKI: Seattle
(d) VALRIO: WA
25 (e) MAA: USA
(f) POSTINUMERO: 98105
- (iv) TIETOKONEELLA LUETTAVISSA OLEVA MUOTO:
(A) VÄLINEEN MUOTO: Kalvoväly
30 (B) TIETOKONE: IBM PC-yhteensopiva
(C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
(D) OHJELMISTO: Patent Release #1,0, versio #1,25 (EPO)
- (vi) HAKEMUKSEN TIEDOT:
35 (A) HAKEMUSNUMERO:
(B) JÄTTÖPÄIVÄ:
(C) LUOKITUS:

(viii) ASIAMIES/ASIAMIESTIEDOT:

(A) NIMI: Sawislak, Deborah A.

(B) REKISTERINUMERO: 37,438

(C) VIITE/VIITENUMERO: 92-20PC

5

(ix) YHTEYSTIEDOT:

(A) PUHELIN: 206-547-8080 ext 427

(AB) TELEFAX: 206-548-2329

10 (2) SEKVENSSIN TIEDOT: SEQ ID NRO 1:

(A) PITUUS: 32 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

15 (ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: Modifioitu kohta

(B) SIJAINTI: 32

(D) MUUTA TIETOA: /amidoitu / huomaa = "C-terminaalinen
proliinitähde on amidoitu"

20

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 1

Cys	Gly	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Met	Leu	Gly	Thr	Tyr	Thr	Gln	Asp	Phe
1				5					10					15	

25	Asn	Lys	Phe	His	Thr	Phe	Pro	Gln	Thr	Ala	Ile	Gly	Val	Gly	Ala	Pro
				20				25					30			

s

(2) SEKVENSSIN TIEDOT: SEQ ID NRO 2:

(A) PITUUS: 32 aminohappoa

30 (B) TYYPPI: aminohappo

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ix) PIIRRE:

(A) NIMI/AVAIN: Modifioitu kohta

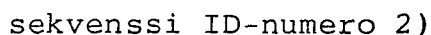
35 (B) SIJAINTI: 32

(D) MUUTA TIETOA: /amidoitu / huomaa = "C-terminaalinen
proliinitähde on amidoitu"

(xi) SEKVENSIN KUVAUS: SEQ ID NRO 2

Cys	Ser	Asn	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	
1				5					10					15		
5	His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asn	Thr	Gly	Ser	Gly	Thr	Pro
				20					25					30		

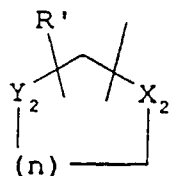
35



30 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t -
t u siitä, että että R on:

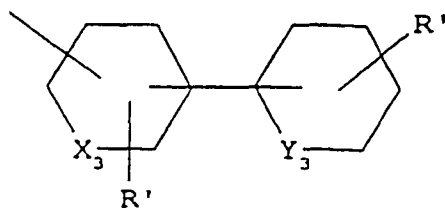
jossa X_1 ja Y_1 ovat itsenäisesti C tai N,

5



jossa $n = 1$ tai 2 , X_2 on N, O tai S ja Y_2 on C tai N,

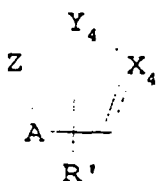
10



15

jossa X_3 ja Y_3 ovat itsenäisesti N, O tai S,

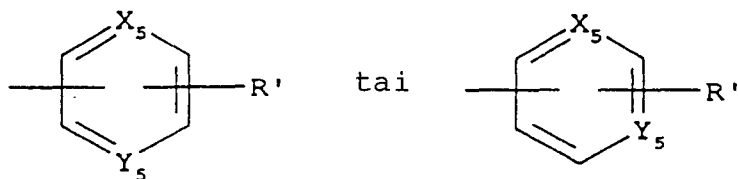
20



25

jossa Y_4 on O, S tai N ja X_4 , Z ja A ovat itsenäisesti C tai N rajoituksella, että X_4 ei ole N kun Y_4 on O tai S, tai

30

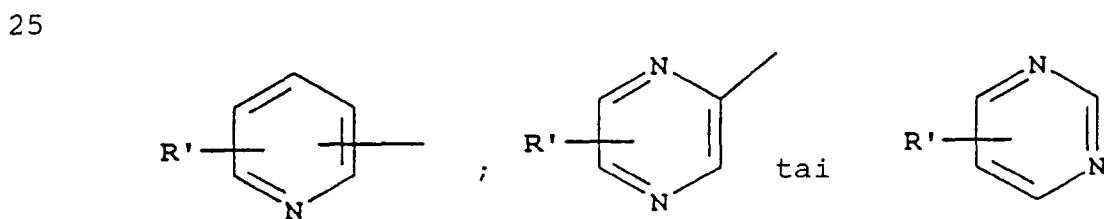
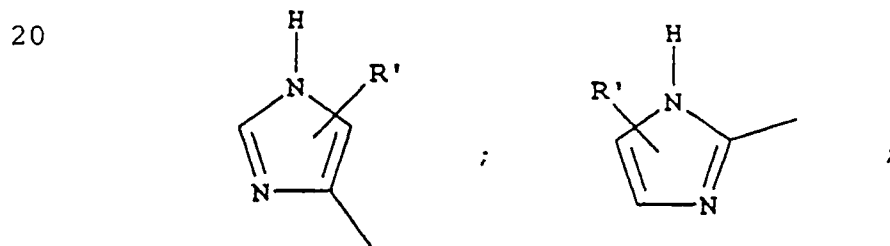
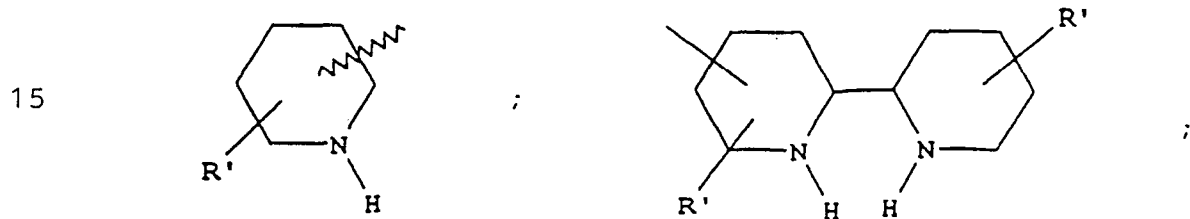
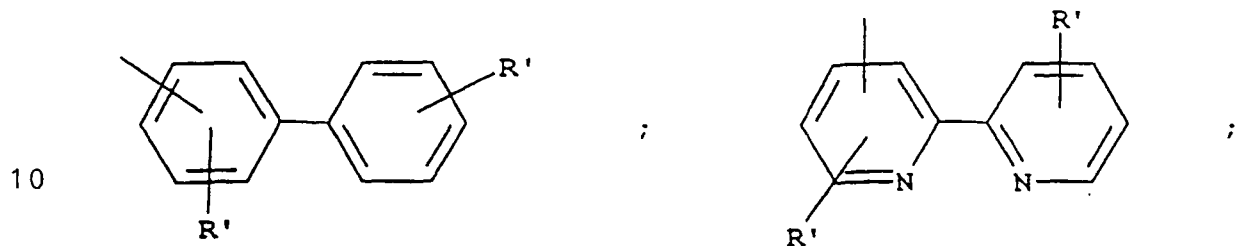


35

jossa X_5 on N ja Y_5 on C tai N,
jossa R' on lineaarinen C_1 - C_8 -alkyyli, haaroittunut C_1 - C_{12} -alkyyli, nitro, hydroksyyli, trifluorimetyyli, karboksyyli,

karboksyyliamidi, sulfhydryyli, syano, halo, alkoksi, esteri tai H.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on:



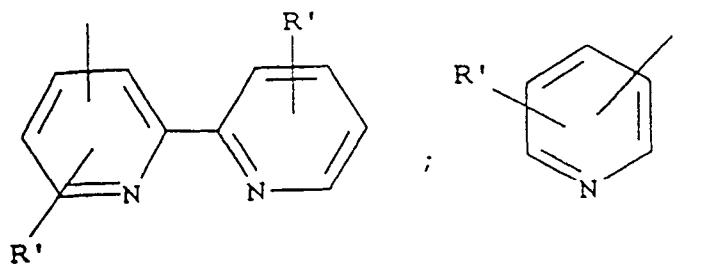
30

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R' on CO₂H.

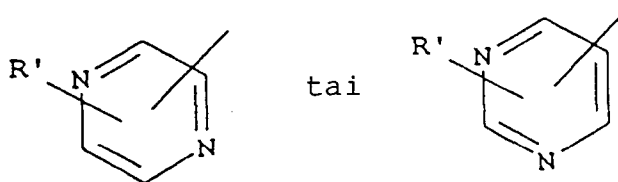
35

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on

5



10

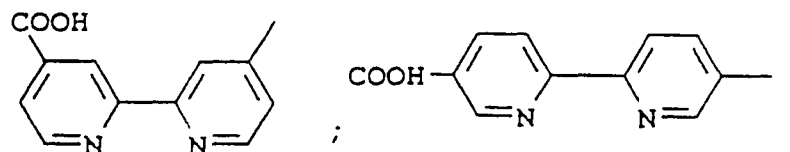


jossa R' on CO₂H tai H.

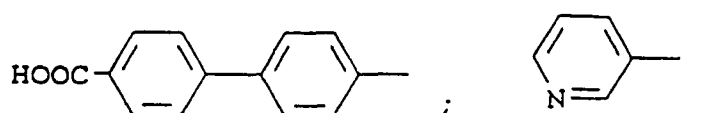
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on fuusioitunut rengasrakenne, joka sisältää kaksi tai kolme rengasta.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on valittu ryhmästä, joka koostuu:

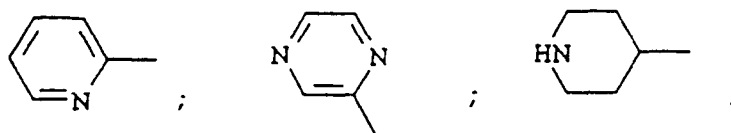
20



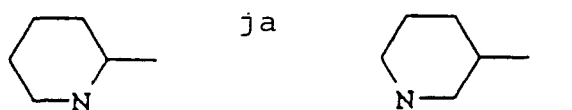
25



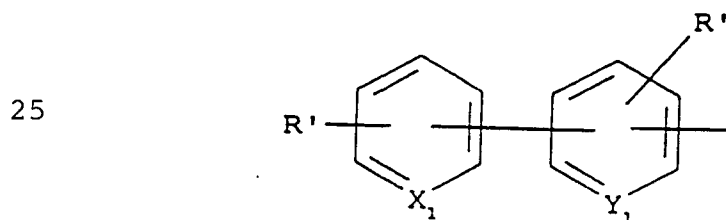
30



35



8. Kaavan R-N-CT mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että CT on kalsitoniini, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ihmisen, lohen, ankeriaan, rotan, sian, naudan, lampaan ja kananpojan kalsitoniineista ja niiden biologisesti aktiivisista johdannaisista ja varianteista tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävistä suoloista, N on amidi-
 5 kytkös ja R on substituoitu tai substituoimaton biaryyli, joka sisältää optionaalisesti 1 tai 2 rengastyyppiä rengasta kohti, substituoitu tai substituoimaton heterosykloalkyyli, joka sisältää 1 tai 2 rengasheteroatomia rengasta kohti mainittujen heteroatomien ollessa valittu ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä tai O:sta, substituoitu tai substituoimaton bis-heterosykloalkyyli, joka sisältää 1 tai 2 heteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka
 10 koostuu N:stä, S:stä ja O:sta, tai substituoitu tai substituoimaton heteroaryyli, joka sisältää 1-4 heteroatomia rengasta kohti valittuna ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä ja O:sta.
- 15 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R on:
- 20

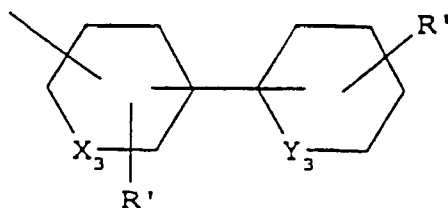


jossa X_1 ja Y_1 ovat itsenäisesti C tai N,
 30



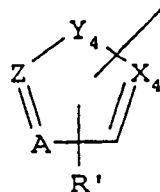
jossa $n = 1$ tai 2 , X_2 on N, O tai S ja Y_2 on C tai N,

5



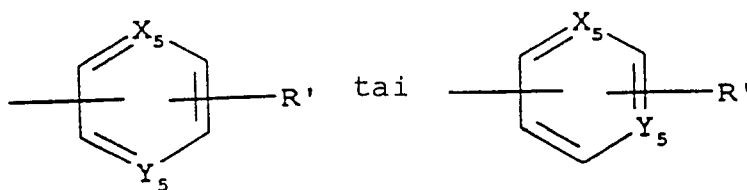
jossa X_3 ja Y_3 ovat itsenäisesti N, O tai S,

10



15 jossa Y_4 on O, S tai N ja X_4 , Z ja A ovat itsenäisesti C tai N rajoituksella, että X_4 ei ole N kun Y_4 on O tai S, tai

20

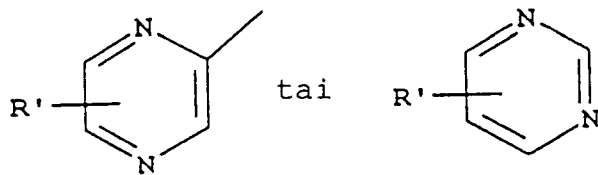
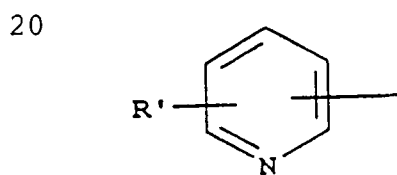
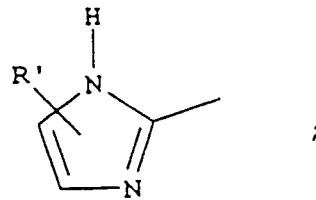
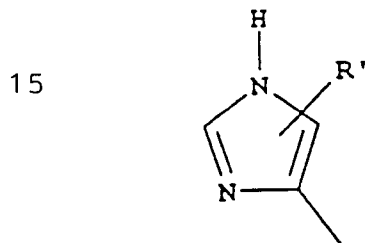
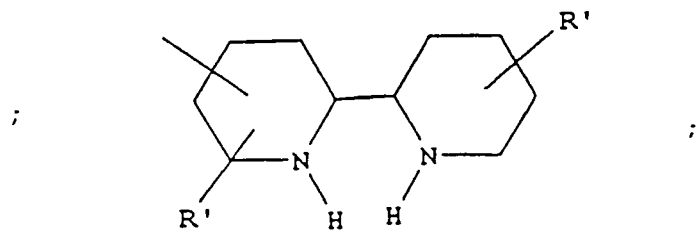
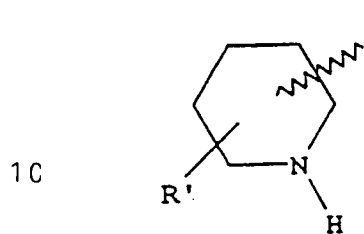
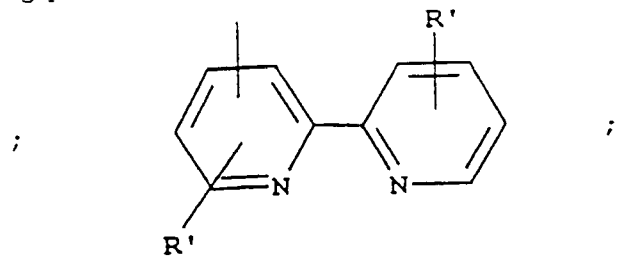
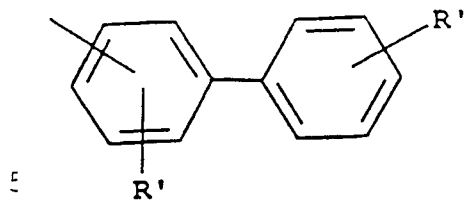


25

jossa X_5 on N ja Y_5 on C tai N, jossa R' on lineaarinen C_1 - C_8 -alkyyli, haaroittunut C_1 - C_{12} -alkyyli, nitro, hydroksyyli, trifluorimetyyli, karboksyyli, karboksyyliamidi, sulf-
30 hydryyli, syano, halo, alkoksi, esteri tai H.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen yhdiste, t u n n e t -
t u siitä, että R on:

35



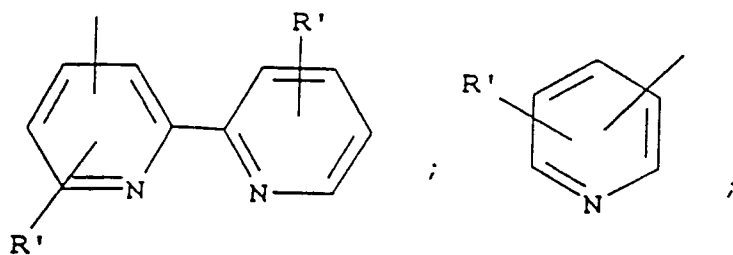
25 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, t u n -
n e t t u siitä, että R' on CO₂H tai H.

12. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, t u n -
30 n e t t u siitä, että CT on ihmisen tai lohen kalsitonii-
ni.

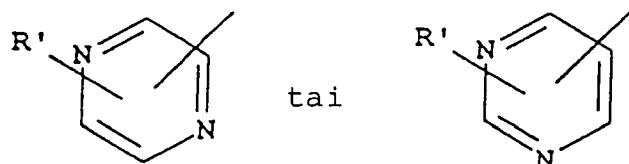
13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, t u n -
n e t t u siitä, että R on:

35

5



10



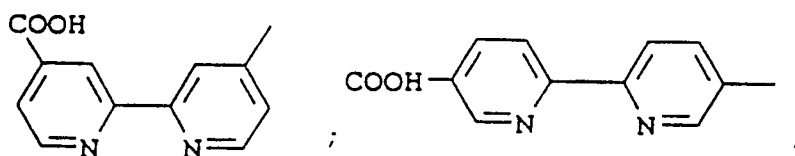
15 jossa R' on CO_2H tai H .

14. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, t u n n e t -
t u siitä, että R on fuusioitunut rengasrakenne, joka si-
sältää kaksi tai kolme rengasta.

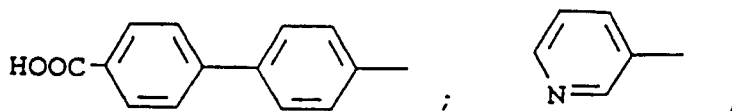
20

15. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, t u n -
n e t t u siitä, että R on valittu ryhmästä, joka koostuu:

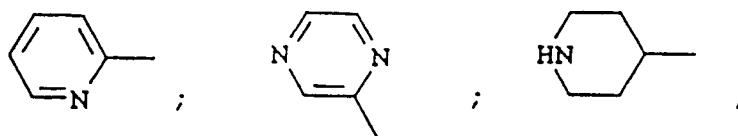
25



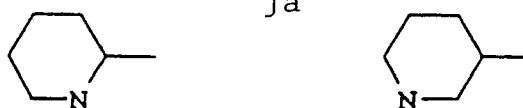
30



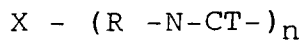
35



ja



16. Yhdiste, jolla on kaava



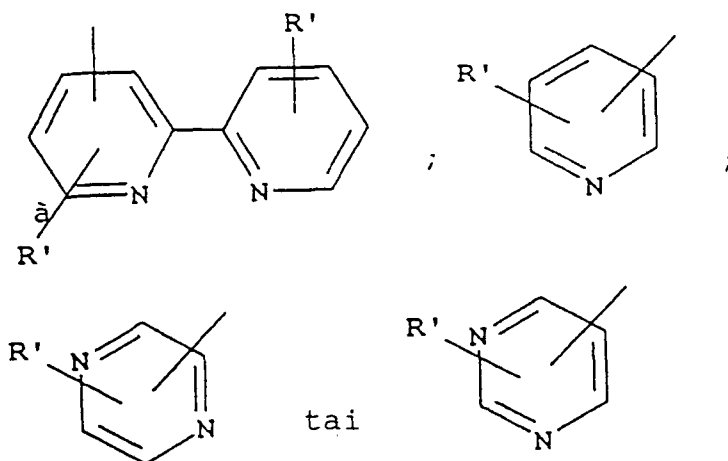
jossa X on siirtymämetallin monovalenttinen, divalenttinen tai trivalenttinen ioni, R on heterosykloalkyyli- tai heteroaryyliryhmä, CT on kalsitoniini, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ihmisen, lohen, ankeriaan, rotan, sian, naudan, lampaan ja kananpojan kalsitoniineista ja niiden biologisesti aktiivisista johdannaisista ja varianteista, N on amidikytkös ja $n = 2$ tai 3 , ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että X on Fe^{2+} .

18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että $n = 3$.

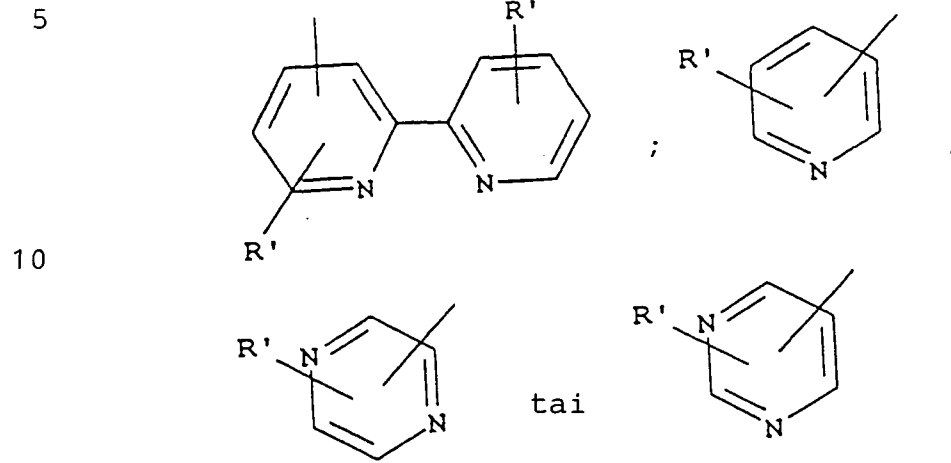
19. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että CT on ihmisen tai lohen kalsitonini.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on



jossa R' on CO_2H tai H.

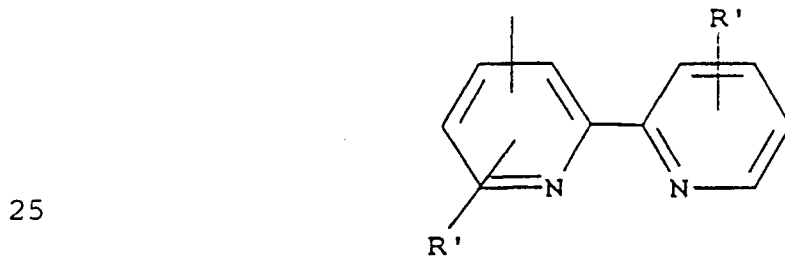
21. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, t u n -
n e t t u siitä, että R on:



jossa R' on CO₂H tai H.

22. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, t u n -
n e t t u siitä, että X on Fe²⁺, R on

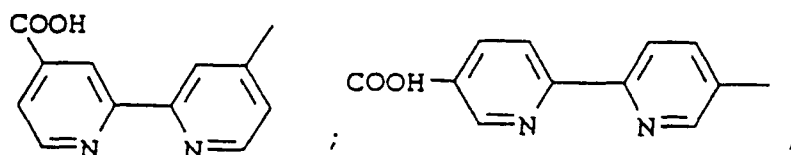
20



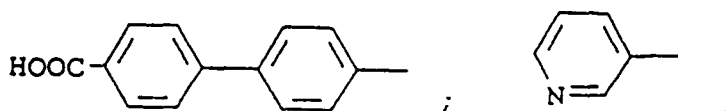
CT on ihmisen tai lohen kalsitoniini ja n = 3.

30 23. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, t u n -
n e t t u siitä, että R on valittu ryhmästä, joka koostuu:

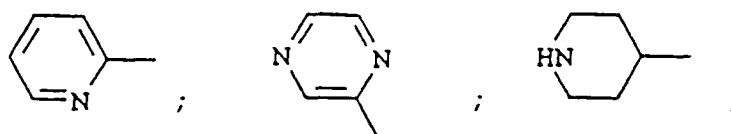
35



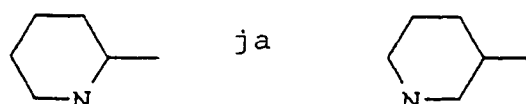
5



10



15



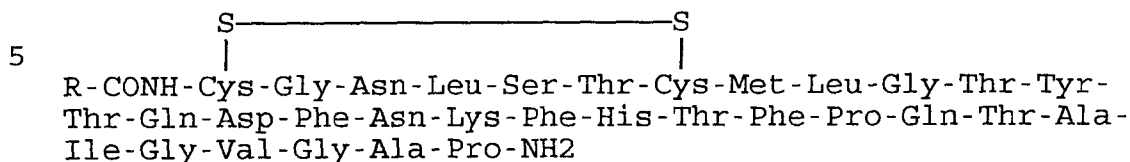
20 24. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, t u n -
n e t t u siitä, että R on fuusioitunut rengasrakenne,
joka sisältää kaksi tai kolme rengasta.

25 25. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä,
että se käsittää patenttivaatimuksen 8 mukaista yhdistettä
ja farmaseuttisesti hyväksyttävää kantoainetta.

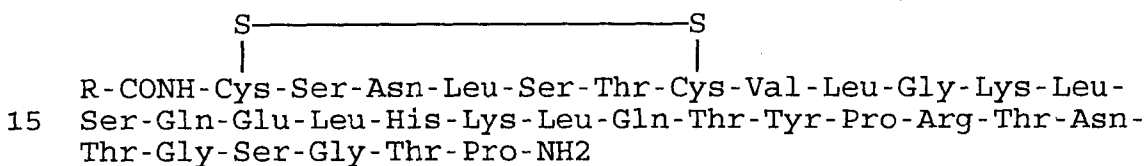
30 26. Menetelmä potilaan seerumin kalsiumin vähentämiseksi,
t u n n e t t u siitä, että se käsittää tehokkaan määrän
patenttivaatimuksen 8 mukaista yhdistettä ja farmaseutti-
sesti hyväksyttävää kantoainetta sisältävän farmaseuttisen
koostumuksen antamisen mainitulle potilaalle.

Patenttivaatimukset

1. Yhdiste, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu



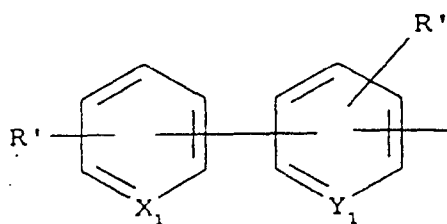
10 (sekvenssi ID-numero 1),



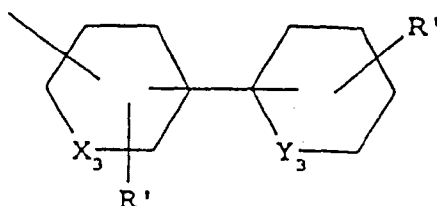
(sekvenssi ID-numero 2)

20 ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävistä suoloista, joissa R on substituoitu tai substituoimaton biaryyli, joka sisältää optionaalisesti 1 tai 2 rengastyyppiä atomia rengasta kohti, tai substituoitu tai substituoimaton bis-heterosykloalkyyli, joka sisältää 1 tai 2 rengasheteroatomia rengasta kohti mainittujen heteroatomien ollessa valittu ryhmästä, joka koostuu, N:stä, S:stä ja O:sta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R on:

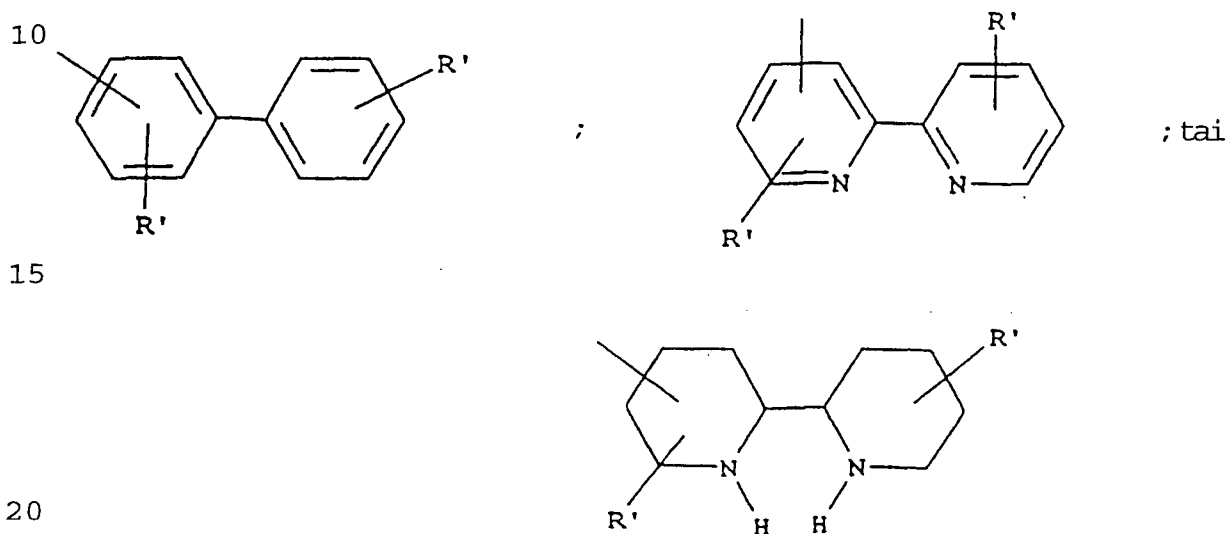


jossa X₁ ja Y₁ ovat itsenäisesti C tai N, tai



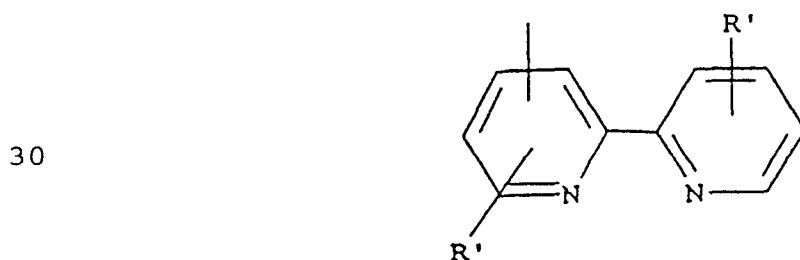
jossa X , ja Y , ovat itsenäisesti N, O tai S,
 jossa R' on lineaarinen C_1 - C_8 -alkyyli, haaroittunut C_1 - C_{12} -alkyyli, nitro, hydroksyyli, trifluorimetyyli, karboksyyli, karboksyyliamidi, sulfhydriyyl, syano, halo, alkoksi, esteri
 5 tai H.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen yhdiste, t u n n e t t u
 siitä, että R on:



4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen yhdiste, t u n n e t t u
 siitä, että R' on CO_2H .

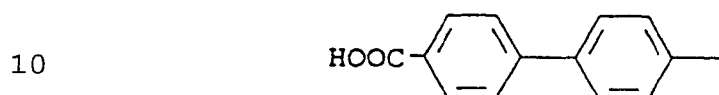
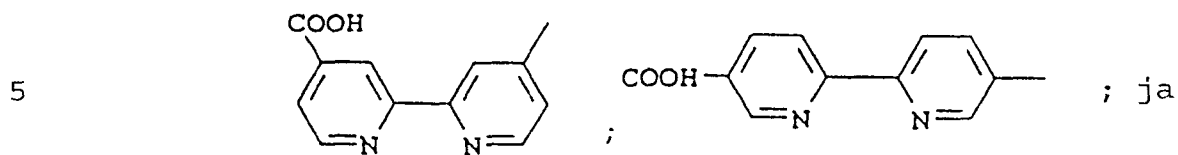
25 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u
 siitä, että R on



jossa R' on CO_2H tai H.

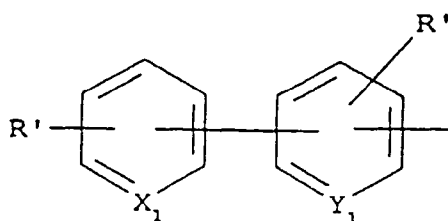
35 6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, t u n n e t t u
 siitä, että R on fuusioitunut rengasrakenne, joka sisältää
 kaksi tai kolme rengasta.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on valittu ryhmästä, joka koostuu:



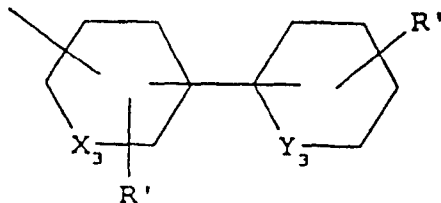
8. Kaavan R-N-CT mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että CT on kalsitoniini, joka on valittu ryhmästä, joka koostuu ihmisen, lohen, ankeriaan, rotan, sian, naudan, lampaan ja kananpojan kalsitoniineista ja niiden biologisesti aktiivisista johdannaisista ja varianteista tai niiden farmaseuttisesti hyväksyttävistä suoloista, N on amidikytös ja R on substituoitu tai substituoimaton biaryyli, joka sisältää valinnaisesti 1 tai 2 rengastyyppiä atomia rengasta kohti, tai substituoitu tai substituoimaton bis-heterosykloalkyyli, joka sisältää 1 tai 2 heteroatomia rengasta kohti mainittujen heteroatomien ollessa valittu ryhmästä, joka koostuu N:stä, S:stä tai O:sta.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on:



jossa X₁ ja Y₁ ovat itsenäisesti C tai N,

31

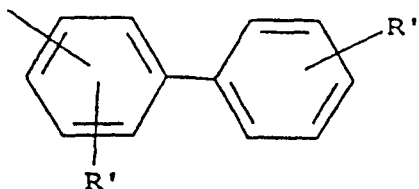


- 5 jossa X_3 ja Y_3 ovat itsenäisesti N, O tai S,
jossa R' on lineaarinen C_1 - C_8 -alkyyli, haaroittunut C_1 - C_{12} -alkyyli, nitro, hydroksyyli, trifluorimetyyli, karboksyyli, karboksyyliamidi, sulfhydriyli, syano, halo, alkoksi, ester tai H.

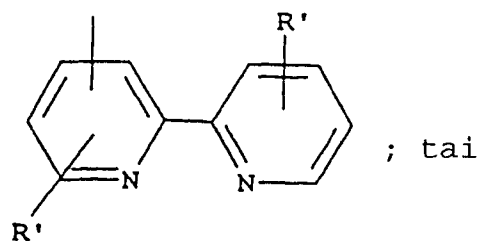
10

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R on:

15

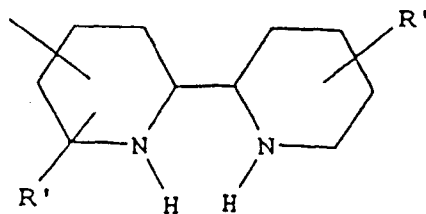


;



; tai

20



25

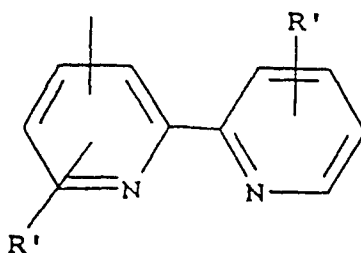
11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R' on CO_2H tai H.

12. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että CT on ihmisen tai lohen kalsitoniini.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdiste, t u n n e t t u siitä, että R on:

35

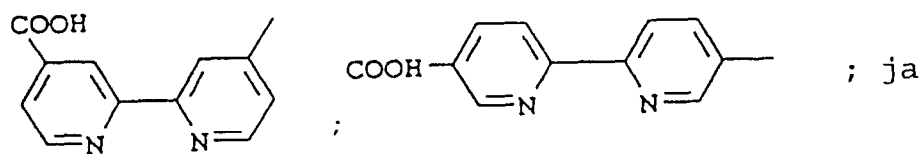
5



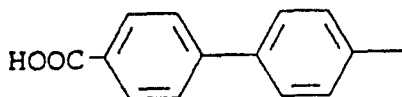
jossa R' on CO₂H tai H.

10 14. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, t u n n e t t u
siitä, että R on fuusioitunut rengasrakenne, joka sisältää
kaksi tai kolme rengasta.

15 15. Patenttivaatimuksen 8 mukainen yhdiste, t u n n e t t u
siitä, että R on valittu ryhmästä, joka koostuu:

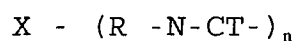


20



25

16. Yhdiste, jolla on kaava



jossa X on siirtymämetallin monovalenttinen, divalenttinen
tai trivalenttinen ioni, R on heterosykloalkyyli- tai hete-
30 roaryyliryhmä, CT on kalsitoniini, joka on valittu ryhmästä,
joka koostuu ihmisen, lohen, ankeriaan, rotan, sian, naudan,
lampaan ja kananpojan kalsitoniineista ja niiden biologisesti
aktiivisista johdannaisista ja varianteista, N on amidikytös
ja n = 2 tai 3, ja sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

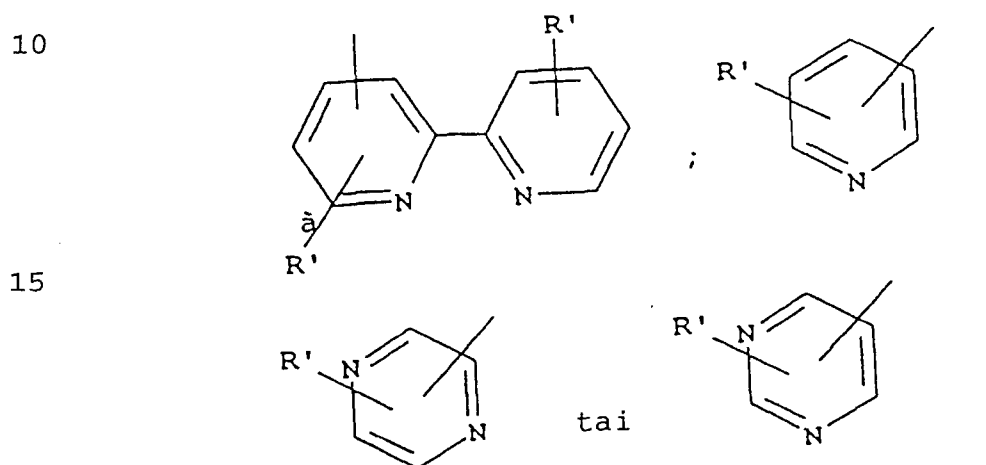
35

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, t u n n e t -
t u siitä, että X on Fe²⁺.

18. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että $n = 3$.

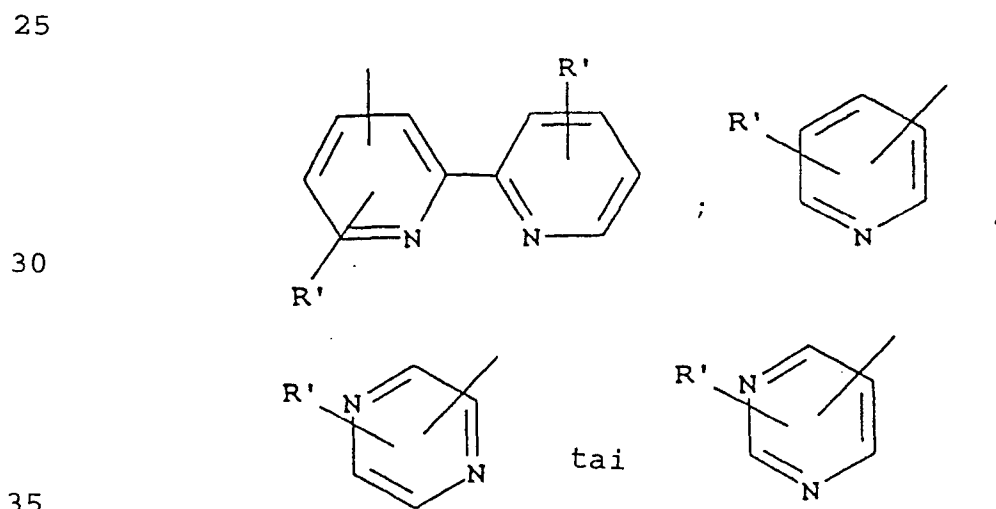
19. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että CT on ihmisen tai lohen kalsitoniini.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on



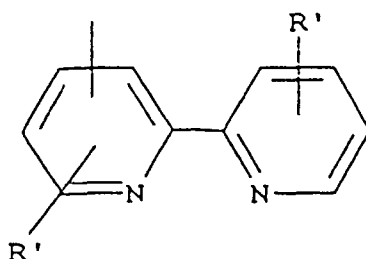
20 jossa R' on CO_2H tai H.

21. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on:



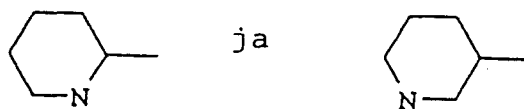
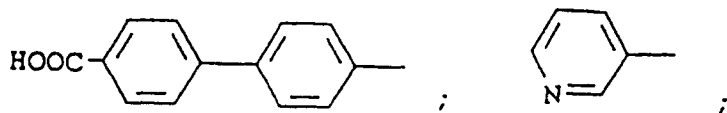
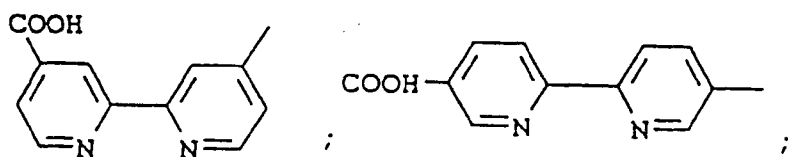
jossa R' on CO_2H tai H.

22. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että X on Fe^{2+} , R on



CT on ihmisen tai lohen kalsitoniini ja $n = 3$.

23. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R on valittu ryhmästä, joka koostuu:



ja

24. Patenttivaatimuksen 16 mukainen yhdiste, t u n n e t -
t u siitä, että R on fuusioitunut rengasrakenne, joka sisäl-
tää kaksi tai kolme rengasta.

5 25. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että
se käsittää patenttivaatimuksen 8 mukaista yhdistettä ja far-
maseuttisesti hyväksyttävää kantoainetta.

26. Menetelmä potilaan seerumin kalsiumin vähentämiseksi,
10 t u n n e t t u siitä, että se käsittää tehokkaan määrän
patenttivaatimuksen 8 mukaista yhdistettä ja farmaseuttisesti
hyväksyttävää kantoainetta sisältävän farmaseuttisen koostu-
muksen antamisen mainitulle potilaalle.

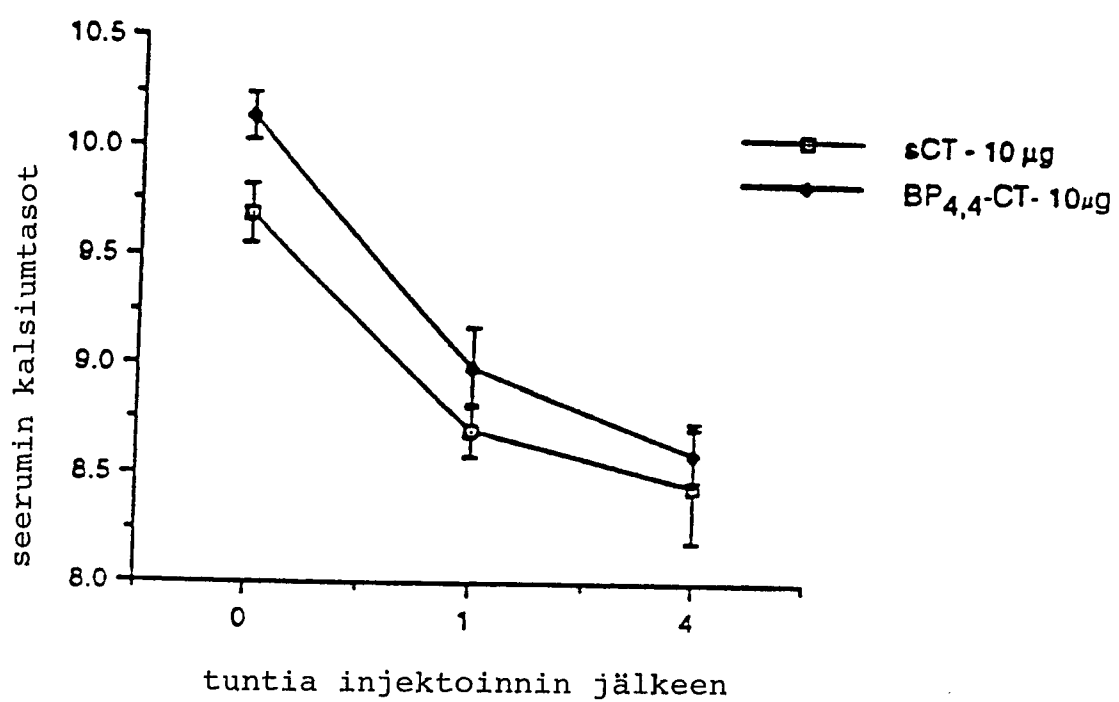


FIGURE 1



Missing

page/

pages