



(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(21) Broj prijave:



HR P20000109A A2

HR P20000109A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. cl.⁷: A 61 K 38/29

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 29.02.2000.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 28.02.2001.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP98/05550

Datum podnošenja međunarodne prijave 02.09.1998.

(87) Broj međunarodne objave: WO 99/12561

Datum međunarodne objave 18.03.1999.

(31) Broj prve prijave: 60/058,324; (32) Datum podnošenja prve prijave: 09.09.1997.; (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: US

(71) Podnositelj prijave:

F. Hoffmann - La Roche AG, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, CH

(72) Izumitelj:

Brian, Henry Vickery, 27977 Via Ventana, Los Altos Hills, 94022 CA, US

(74) Punomoćnik:

CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.d., ZAGREB, HR

(54) Naziv izuma:

LIJEČENJE PRIJELOMA UPOTREBOM PTHrP ANALOGA

(57) Sažetak: Predloženim izumom date su metode za liječenje kostiju i popravak prijeloma koje uključuju davanje učinkovite količine polipeptidnog analoga paratiroidnog hormona srodnog peptida (PTHrP) i njegovih soli pacijentu kojem je to potrebno, u kojem polipeptidu ostaci amino kiselina 22-31 oblikuju amfipatsku α -uzvojnica, ili upotrebu takovih polipeptida za pripravljanje lijeka za liječenje kostiju i popravak prijeloma.

HR P20000109A A2

U Sjedinjenim američkim državama bilježi se godišnje približno 8-10 milijuna prijelom kostiju, pri čemu je za njih više od 1 milijuna potrebna hospitalizacija. Utvrđeni godišnji troškovi liječenja tih prijelom prelaze 20 milijardi dolara. Iako je već i to značajno, očekuje se da će ti brojevi porasti zbog starenja opće populacije. Također, iako su neke terapije indikativne za prevenciju gubitka koštanog tkiva sa starenjem, malo je terapija indikativnih za liječenje kad se dogodi prijelom. Za većinu terapija potrebna je lokalna aplikacija, što je nepoželjno zbog složenosti isporuke i slabog pristanka pacijenta. Zbog su poželjne dodatne metode za olakšavanje liječenja kosti i popravak prijeloma.

Nedavno je objavljeno da povremeno liječenje s paratiroidnim hormonom (PTH) poboljšava liječenje prijelom kod štakora kojima je izvađen ovarij, što pokazuje da se liječenje s PTH možda može primijeniti za liječenje osteoporoznih prijelom u menopauzi (H.W. Kim et al., Izvještaj sa 43. godišnjeg sastanka Društva za ortopedsku istraživanja, Sv. 22, Dio 1, Sažetak, 181-31, veljača 9-13, 1997; H.W. Kim et al., Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 11, Dodatak 1, str. 152, Sažetak str. 248 (august 1996)). Drugi istraživači su objavili da ugradnja genski aktiviranog matriksa koji umnaža morfogenetski koštani protein-4 i/ili fragment od PTH (amino kiseline 1-34) u modelu prijeloma segmentiranog defekta u štakora uzrokuje stvaranje nove koštane mase koja premošćuje razmak brže nego u neobrađenoj kontroli, (Jianming Fang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), Vol. 93:5753-5758 (June 1996)). Također je objavljeno da se razni PTH analozi mogu upotrijebiti za liječenje osteoporoze (U.S. patenti br. 5,556,940 i 5,559,792). Druge metode liječenja prijeloma uključuju humani trombocitni faktor 4 (U.S. patent br. 5,622,935), benzotiofene (U.S. patent 5,502,074) i 24,25(OH)₂ vitamin D₃ (U.S. patent 5,069,905).

PTH-u srodan peptid (PTHrP), ranije poznat kao faktor koji je odgovoran za humoranu hiperkalcemiju malignancije, je peptid od 138-174 amino kiselina (ovisno o alternativnom ispreplitanju) koji se veže na PTH/PTHrP receptor. N-terminalna sekvenca PTHrP-a od 34 amino kiseline ima ograničenu sekvencnu homologiju s PTH, ali u nekim slučajevima pokazuje jednako djelovanje kao PTH. Međutim, PTHrP je općenito slabiji i slabiji koštani anabolik od PTH i nije bio povezan s liječenjem prijeloma. Sekvenca u hPTHrP (1-34) je slijedeća:

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).

Bilo je obznanjeno nekoliko skraćenih homologa i analoga od PTHrP-a. Analozi, u kojima su ostaci amino kiselina 22-31 u PTHrP(1-34) zamijenjeni s amfipatskom α -uzvojnicom (U.S. patent br. 5,589,452 i WO 97/07815) i srodni derivati, bili su opisani kao korisni za liječenje osteoporoze. (B.H. Vickery et al., J. Bone & Mineral Research, 11 (12):1943-1996; D. Leaffer et al., Endocrinology, 136(8):3624-3631 (1995)). Pokazalo se je da se monociklički i biciklički analozi od PTHrP (1-34) i PTHrP (7-34) jako vežu na PTH receptor i stimuliraju (ili antagoniziraju) djelovanje adenil ciklaze stimulirano s PTH u stanicama koje su slične osteoblastima (Michael Chorev et al., Biochemistry, 36:3293-3299 (1997) i WO 96/40193).

U jednom aspektu, izumom su date metode za liječenje kosti i popravak prijeloma koje uključuju davanje učinkovite količine polipeptidnog analoga paratiroidnom hormonu srodnog peptida (PTHrP) i njegovih soli pacijentu kojem u to potrebno, u kojem polipeptidu ostaci amino kiselina 22-31 oblikuju amfipatsku α -uzvojnica, prednosno sastavljen od hidrofilnih amino kiselina (Haa) i lipofilnih amino kiselina (Laa) raspoređenih u sekvencu:

Haa (Laa Laa Haa Haa)₂ Laa; ili upotreba takovih spojeva za proizvodnju lijeka za liječenje takovih poremećaja.

Kad se primjerne izvedbe ove amfipatske uzvojnice ugrade u PTHrP sekvencu, posebno u N-terminalno skraćeni oblik humanog PTHrP (ostaci 1-32 pa sve do 1-38), dobiveni polipeptidi su učinkoviti u liječenju kosti i popravku prijeloma. Sistemsko davanje je prednosni način isporuke polipeptida.

Kratki opis priloženih slika:

Slika 1 prikazuje tjednu radiografsku gustoću segmentiranog defekta kosti u modelu frakture na štakoru kroz pet tjedana liječenja s PTHrP analozima B ili C u usporedbi s kontrolom. Vidi se, da je nakon 4 tjedna rast kosti kod ozlijeđenih životinja liječenih s PTHrP analozima bio veći nego u kontrolnim skupinama. PTHrP analozi B i C su (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹Ala¹⁹hPTHrP(1-34)NH₂ i (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹His²⁶hPTHrP(1-34)NH₂.

Slika 2 prikazuje radiografski omjer gustoće segmentirane kosti prema kontralateralnom femuru (kontrola) u modelu prijeloma segmentiranog defekta na štakoru nakon 6 tjedana liječenja s kontrolom ili PTHrP analozima B ili C. U usporedbi s kontrolno liječenim štakorima, štakori liječeni s PTHrP analozima B i C imali su povećanu gustoću kosti.

Slika 3 prikazuje radiografe visoke rezolucije koštanih defekata u modelu prijeloma segmentiranog defekta na štakorima nakon 6 tjedana kontrolnog liječenja (3A) ili liječenja s PTHrP analogom C (3B). Radiograf pokazuje da kontrolni defekt ostaje nesrašćen, dok se je defekt liječen s PTHrP analogom C izliječio.

Slike 4A i 4B pokazuju liječenje intramembranoznog koštanog defekta kod štakora nakon liječenja s PTHrP analogom D, (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP(1-34)NH₂ s dvije različite doze.

Slika 5 prikazuje omjer srašćivanja postignut u modelu liječenja frakture, koje je bilo usporeno uvođenjem kortikosteroida, s PTHrP analogom D, (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP(1-34)NH₂.

U nastavku je dat opis izuma s više pojedinosti.

Jednoslovne i troslovne kratice raznih općih nukleotidnih baza i amino kiselina u skladu su s preporukama datim u Pure Appl. Chem. 31:639-645 (1972) i 40:277-290 (1974). Ako nije navedeno drugačije, kao D ili D,L, kratice predstavljaju L amino kiseline. Određene amino kiseline, prirodne i sintetičke, su akiralne, npr. glicin. Sve peptidne sekvence prikazane su s N terminalnom amino kiselinom na lijevoj i C terminalnom amino kiselinom na desnoj strani.

Podrazumijeva se, da obje vrste amino kiselina, tj. prirodne i neprirodne amino kiseline mogu biti prisutne u PTHrP analogima koji se upotrebljavaju u ovom izumu. Primjeri neprirodnih amino kiselina i njihove kratice uključuju homoserin (hSer), homoserin laktan (hSerlac), homocistein (Hcy), homoarginin (hArg), homocitrulin (Hci), penicilamin (Pen), N- α -metilarginin (N-MeArg), norleucin (Nle), norvalin (Nval), norizoleucin (Nlle), N-metil-izoleucin (N-Melle), fenilglicin (PhG), t-butilglicin (Tle), hidroksiprolin (Hyp), 3,4-dehidroprolin (Δ -Pro), piroglutamin (Pyr, Glp), ornitin (Orn), 1-aminoizomaslačna kiselina (1-Aib), 2-aminoizomaslačna kiselina (2-Aib), 2-aminomaslačna kiselina (2-Abu), 4-aminomaslačna kiselina (4-Abu), 2,4-diaminomaslačna kiselina (A2bu), α -amino-suberinska kiselina (Asu), albicin (Abz), β -cikloheksil-alanin (Cha), 3-(1-naftil)alanin (1-Nal), 3-(2-naftil)-alanin (2-Nal), citrulin (Cit), pipekolinska kiselina (Pip), 4-klorfenilalanin (4-ClPhe), 4-fluorfenilalanin (4-Fphe), sarkozin (Sar) i 1-aminopropankarboksilna kiselina (1-NCPC). Objе vrste, tj. prirodne i neprirodne amino kiseline su komercijalno dostupne od tvrtki kao što je Nova Biochem (San Diego, Ca, USA) i Bachem (Torrance, CA, USA).

Analozi PTHrP polipeptida opisani su s obzirom na njihovo odstupanje od izvorne sekvence u hPTHrP. Kratica (MAP₁₋₁₀) odnosi se na posebnu, dolje prikazanu, amfipatsku sekvencu uzvojnice,

Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu (sekv. br.2)

tj. sekvencu MAP koja sadrži deset ostataka amino kiselina.

Stoga se, dakle, sekvenca označena s

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP(1-34) odnosi na 1-34 N-terminalni ostatak u polipeptidu hPTHrP u kojem je segment između ostataka 22 i 31 zamijenjen s MAP sekvencom. Unutar MAP sekvence mogu se označiti i dodatne promjene. Tako se, npr.

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹His²⁶hPTHrP(1-34) odnosi na 1-34 N-terminalni ostatak u hPTHrP u kojem je segment između ostataka 22 i 31 zamijenjen sa sekvencom MAP u kojoj se histidin nalazi na položaju 26 (umjesto lizina koji bi se tu nalazio u standardnoj sekvenci MAP).

Slično su označene i dodatne promjene u odnosu prema prirodno nastaloj sekvenci. (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹Pro³²hPTHrP(1-32) odnosi na 1-32 N-terminalni ostatak u hPTHrP u kojem se sekvenca MAP nalazi na položajima 22-31 i s prolinom (koji zamjenjuje prirodno nastali histidin) na položaju 32.

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹D-Orn³⁴laktam-hPTHrP (1-34) odnosi na 1-34 N-terminalni ostatak u hPTHrP u kojem se sekvenca MAP nalazi na položajima 22-31 i ornitin je na položaju 34 s laktamom oblikovanim između amino skupine ornitinskog bočnog lanca i karboksi završetka.

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hSer³⁴hPTHrP(1-34)Thr His Ile Gln NH₂ odnosi na 1-34 N-terminalni ostatak u hPTHrP u kojem se sekvenca MAP nalazi na položajima 22-31, homoserinom je na položaju 34, s dodatnom sekvencom Thr His Ile Gln na položajima 35-38 i s karboksi završetkom koji je primarni amid.

Polipeptidi sa cikliziranim vezama između ostataka amino kiselina označeni su dva povezana ostatka stavljena u zagradu i ispred njih je slovo "c". Općenito, veze između dva ostatka nastaju između funkcionalnih skupina bočnog lanca, tipično kao amidne ili esterske veze. Stoga se dakle (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹c[Lys¹³,Asp¹⁷]hPTHrP(1-34)hSer³⁴ laktan odnosi na 1-34 N-terminalni ostatak u hPTHrP u kojem je segment između ostataka 22-31 zamijenjen sa sekvencom MAP, amino bočni lanac lizina na položaju 13 cikliziran je s karboksilnom skupinom bočnog lanca aspartata na položaju 17 i dodatno ima homoserin na položaju 34 s laktanom oblikovanim između hidroksilnog bočnog lanca homoserina i karboksilnog završetka. Slično, (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹c[Lys¹³,Asp¹⁷]hPTHrP(1-34) odnosi na 1-34 N-terminalni ostatak u hPTHrP u kojem je segment između ostataka 22-31 zamijenjen sa sekvencom MAP, a amino bočni lanac

lizina na položaju 13 cikliziran je s karboksilnom supinom bočnog lanca aspartata na položaju 17.

"Hidrofилна amino kiselina (Haa)" odnosi se na amino kiselinu koja, pored skupine potrebne za tvorbu peptidne veze, ima najmanje jednu hidrofилnu funkcionalnu skupinu, kao arginin, asparagin, aspartanska kiselina, glutaminska kiselina, glutamin, histidin, lizin, serin, treonin i njihovi homolozi.

"Lipofilna amino kiselina (Laa)" odnosi se na alifsku ili aromatsku amino kiselinu bez naboja, kao što su izoleucin, leucin, metionin, fenilalanin, triptofan, tirozin, valin i njihovi homolozi.

U okviru ovog izuma alanin je klasificiran kao "amfifilnan", tj. on može djelovati hidrofилno ili lipofilno.

"Polipeptidni analog od PTHrP" odnosi se na polipeptid koji ima u struci prihvaćene supstitucije, brisanja ili umetke u odnosu prema PTHrP, ili je uglavnom homologan s PTHrP, tako da analog ima isto fiziološko djelovanje.

"Fiziološki aktivan skraćeni PTHrP analog" odnosi se na polipeptid sa sekvencom koja sadrži manje od cjelovitog komplementa amino kiselina nadenih u PTHrP koji, međutim, uzrokuje istu fiziološku reakciju. Za izazivanje istih fizioloških reakcija, skraćeni PTHrP analozi ne moraju biti potpuno homologni s PTHrP. Tipično, skraćeni analozi se skraćuju od C završetka i imaju raspon od 30 do 40 ostataka, pri čemu su prednosni PTHrP(1-32), PTHrP(1-34) i PTHrP(1-38), ali ne predstavljaju isključivo tu skupinu. Općenito, analozi nose konzervativne supstitucije amino kiselina u skladu s parametrima prihvaćenim u struci kako je dolje opisano.

Pojam "uglavnom homologan", kad se odnosi na polipeptide, znači da dotični polipeptid pokazuje najmanje približno 80%-tnu homologiju, uobičajeno približno 90%-tnu homologiju, a prednosno 95%-tnu homologiju s navedenim polipeptidom. Homologija polipeptida mjeri se tipično pomoću računalnog programa za analizu sekvenci (vidi npr. Sequence Analysis Software Package tvrtke Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705 USA).

"Amfipatska α -uzvojnica" odnosi se na sekundarnu strukturu koju imaju određeni polipeptidi i u kojima amino kiseline poprimaju konfiguraciju α -uzvojnice koja ima suprotne polarne i nepolarne strane usmjerene po uzdužnoj osi uzvojnice. Stručnjaci mogu konstruirati amfipatske sekvence uzvojnice. Posebne amfipatske sekvence uzvojnice prikladne za upotrebu prema metodi ovog izuma opisane su s više pojedinosti u U.S. patentu br. 5,589,452 ili WO 97/07815.

Predloženi izum temelji se na otkriću da su određeni PTHrP analozi, koji sadrže amfipatsku α -uzvojnica na položajima 22-31, učinkoviti u liječenju kosti i popravku prijeloma. Amfipatska α -uzvojnica je sastavljena od hidrofилnih amino kiselina (Haa) i lipofilnih amino kiselina (Laa) poredanih u sekvencu:



Kad se primjerne izvedbe ove amfipatske uzvojnice ugrade u PTHrP sekvencu, posebno u N-terminalno skraćeni oblik humanog PTHrP (ostaci 1-32 pa sve do 1-38), dobiveni polipeptidi su učinkoviti u liječenju kosti i popravku prijeloma. Za razliku od PTH, PTHrP ili njihovih analoga koji nemaju taj amfipatski segment uzvojnice, analozi koji se ovdje upotrebljavaju ne uzrokuju hiperkalcemiju. K tome, ovi analozi induciraju mnogo brži rast kosti nego PTH ili PTHrP.

Podrazumijeva se, da pored toga što sadrže amfipatsku uzvojnica između položaja 22 i 31, u sekvenci PTHrP-a izvan tog područja može se učiniti mnoštvo supstitucija, brisanja i umetanja amino kiselina, sve dok je očuvana trodimenzionalna struktura polipeptida. Tipične varijacije sekvenci u PTH ili u PTHrP, koje zadržavaju fiziološko djelovanje dobivenih analoga, obznanjene su u U.S. patentima br. 5,599,792, 5,556,940, 5,607,915 i 5,589,452 i u WO 91/06564, WO 94/02510, WO 95/11697, WO 96/40193 i WO 97/07815. Dodatne promjene, za koje bi stručnjak mogao predviđati da zadržavaju fiziološko djelovanje, mogu se učiniti postupcima modeliranja strukture proteina koji su prihvaćeni u struci. Tipične metodologije za izvedbu takovih inačica opisali su, između ostalog, I. Ladunga i R.F. Smith u Protein Eng. 3:187-196 (1997) i M.J. Thompson i R.A. Goldstein u Proteins, 1:28-37 (1996).

Supstitucijske inačice su one u kojima je najmanje jedna amino kiselina odstranjena iz izvorne sekvence, a na njeno mjesto na istom položaju ugrađena je drugačija amino kiselina. Te supstitucije mogu biti jednostruke, gdje se zamjenjuje samo jednu amino kiselinu, ili višestruke gdje se zamjenjuju dvije ili više amino kiselina u istoj molekuli. Općenito se predviđa da će biti dopuštene sve konzervativne supstitucije. Zbog toga se predviđa da će analog koji odgovara supstituciji jedne hidrofилne amino kiseline s drugom hidrofилnom amino kiselinom ili hidrofobne kiseline s drugom hidrofobnom kiselinom zadržati slična svojstva u liječenju frakture kao i njegov prekursor. Supstitucije također uključuju PTHrP analoge u kojima je C terminalni ostatak prisutan kao amid. Dodatne supstitucije se mogu učiniti na osnovi amino kiselina koje imaju ili nemaju naboja. Za daljnje olakšavanje supstitucija, svaka od tih skupina može se dalje podijeliti u podskupine.

Amino kiseline s nabojem:

Kiseli ostaci: aspartinska kiselina, glutaminska kiselina, 2-amino suberinska kiselina.

Bazični ostaci: lizin, arginin, histidin, ornitin. Amino kiseline bez naboja:

Hidrofilni ostaci: serin, treonin, asparagin, glutamin, metionin.

5 Alifatski ostaci: glicin, alanin, valin, leucin, norleucin, izoleucin.

Nepolarni ostaci: cistein, homocistein, metionin, prolin.

Aromatski ostaci: fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin.

10 Alternativno, supstitucije amino kiselina mogu se temeljiti na načelu bioizosterizna. Takove bioizosterične supstitucije tipično minimiraju sve prekidne konformacijske učinke koji može stvoriti nasumična supstitucija. Postupak pretraživanja alanina može se primijeniti za identifikaciju položaja gdje se očekuje izosteričku supstituciju da se osiguraju inačice koje zadržavaju fiziološko djelovanje. (Vidi, npr. K.H. Pearce Jr., M.H. Ultsch, R.F. Kelly, A.M. de Vos i J.A. Wells, *Biochemistry*, 35 (32): 10300-10307 (1996) i B. Li, J.Y. Tom, D Oare, R. Yen, W.J. Fairbrother, J.A. Wells i B.C. Cunningham, *Science*, 270, 1657-1660 (1995)). Tipične izosteričke amino kiseline navedene su u dolnjoj

15 tablici:

Amino kiselina	Izosterička amino kiselina
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

Inačice brisanja su one u kojima je iz izvorne sekvence amino kiselina odstranjena jedna ili više amino kiselina. Redovito, u inačicama brisanja u dotičnom području molekule uklonjena je jedna ili dvije amino kiseline. Prikladno je da se brisanja vrše na kraju sekvence, posebno na karboksi završetku. Dakle, iako su prednosni fragmenti PTHrP(1-34),

20 sekvence koje su dalje skraćene na karboksilnom kraju također su učinkovite u liječenje kosti.

Promjene s umetanjem ili dodavanjem su one u kojima je amino kiselina umetnuta neposredno susjedno do amino kiseline u dotičnom položaju izvorne sekvence. Neposredno susjedno do amino kiseline znači povezano ili na α -karboksi ili na α -amino skupinu amino kiseline. Promjene dodavanjem ili umetanjem također se mogu prikladno izvršiti

25 na krajevima sekvenci, i opet najprikladnije na karboksi završetku.

Od gore navedenih modifikacija izvorne sekvence, prednosne su supstitucije, adicije i brisanja na karboksi kraju.

30 Polipeptidni PTHrP analozi, koji se mogu upotrijebiti za liječenje prijeloma, kako su ovdje opisani, općenito su opisani u U.S. patentnu br. 5,589,452 i WO 97/07815. Dodatni analozi uključuju cikličke analoge N terminalnog hPTHrP(1-32), hPTHrP(1-34) i hPTHrP (1-38), koji sadrže sekvencu MAP između položaja 22 i 31 i prema potrebi imaju ostatke na položajima 13 i 17 i/ili 26 i 30 povezane preko njihovih funkcionalnih skupina bočnog lanca. Stručnjak će uočiti da se može izvršiti mnoštvo supstitucija na položajima 13 i 17 koje će omogućiti ciklizaciju između ta dva položaja.

35 PTHrP analozi bilo koje vrste sisavaca, npr. ljudski, govedi, svinjski ili zečji mogu se upotrijebiti u ovom izumu, pri čemu se prednost daje humanom PTHrP. Stručnjak će priznati da su inačice supstitucije, brisanja i umetanja dolje navedenih prednosnih izvedbi, u skladu s gore opisanim i u struci prihvaćenim, načelima također obuhvaćene smislom izuma.

40 Prednosne izvedbe uključuju upotrebu hPTHrP(1-34) analoga s MAP sekvencom na položajima 22-31, posebno one

koje na položaju 26 imaju amino kiselinu s pozitivnim nabojem, npr. lizin. Specifične izvedbe unutar tog razreda jesu:

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP(1-34) NH₂

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

5 i
(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹His²⁶hPTHrP(1-34) NH₂

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

10 Druge prednosne izvedbe uključuju upotrebu hPTHrP(1-34) analoga s MAP sekvencom na položajima 22-31 koji dodatno sadrže mono- ili bicikličku strukturu nastalu ciklizacijom između funkcionalnih skupina bočnog lanca ostataka amino kiselina, posebno između ostataka 13 i 17 ili između ostataka 26 i 30. Funkcionalne skupine bočnog lanca jesu tipično amino, hidroksi ili karboksilne skupine i do ciklizacije dolazi tvorbom amidne ili esterske veze. Ostaci s amino funkcionalnom skupinom na bočnom lancu uključuju lizin ili ornitin. Ostaci s karboksilnom funkcionalnom skupinom na bočnom lancu uključuju aspartinsku kiselinu i glutaminsku kiselinu. Specifične izvedbe unutar tog razreda uključuju:

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹c[Lys¹³,Asp¹⁷]hPTHrP(1-34) hSer³⁴lactone

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)

15 i
(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹c[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).

20 Drugi hPTHrP analozi, koji se mogu upotrijebiti prema ovom izumu, jesu N-terminalne sekvence s 30 do 50 ostataka, ponajprije s 1-32, 1-33, 1-34, 1-35, 1-36, 1-36 i 1-38 koje sadrže MAP sekvencu na ostacima 22-31 i prema potrebi imaju jednu ili više supstitucija u položaju 5, 13, 17, 19, 26, 30, 32 ili 34. Specifične izvedbe unutar tog razreda uključuju:

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹Ile⁵hPTHrP(1-34) NH₂

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

25 (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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH₂ (SEQ ID
NO:8),

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹Pro³²hPTHrP(1-32) NH₂

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),

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹D-Orn³⁴lactam hPTHrP (1-34)

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

30 (MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP (1-34) A2bu³⁴lactam

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

i

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hScr³⁴PTHrP(1-34)THIQ NH₂

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser IleGln 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).

- 5 Općenito, svi polipeptidi koji uglavnom homologni s ovdje opisanim specifičnim izvedbama mogu se upotrijebiti po metodama prema izumu. Uobičajeno, polipeptidi upotrijebljeni u predloženom izumu homologni s ovdje obznanjenim specifičnim izvedbama najmanje pribl. 50%, prednosno više od pribl. 80% i još bolje više od pribl. 90%, a najbolje najmanje pribl. 95%. Duljina polipeptidnih sekvenci uspoređenih zbog homologije općenito je najmanje pribl. 20 amino kiselina, uobičajeno najmanje pribl. 24 ostatka, tipično najmanje pribl. 30 ostataka, a prednosno između 32 i 40 ostataka.

- 15 Spojevi upotrijebljeni u predloženom izumu mogu se proizvesti metodama opisanim u U.S. patentnu br. 5,589,452, WO 96/40193 i WO 97/07815. Spojevi se općenito proizvode sintezom na krutoj fazi, sintezom u otopini i rekombinantnim metodama koje se provode kloniranjem i ekspresijom gena koji kodira za dotični polipeptid, koje su sve poznate stručnjacima. Sinteze na krutoj fazi imaju prednost kod skraćenih PTHrP homologa od četrdeset ili manje amino kiselina. Analози sa cikliziranim bočnim lancima općenito se proizvode spajanjem potpuno zaštićenog polipeptida na smolu, odstranjivanjem zaštitnih skupina i provedbom ciklizacije s odgovarajućim sredstvom za povezivanje, kao što je benzotriazol-1-iloksi-tris-(pirolidino)fosfonijev heksafluorofosfat (PyBOP) neposredno prije oslobađanja polipeptida sa smole.

- 20 Ovdje obznanjene metode liječenja mogu se primijeniti za liječenje prijeloma kostiju i osteotomija, uključiv oboje, spojene i nespojene prijelome. Tipovi prijeloma koji se mogu liječiti pomoću metoda ovog izuma uključuju oboje, traumatske i osteoporozne frakture, npr. frakture kuka, uskog dijela bedrene kosti, zgloba, kralježnjaka, kralježnice, rebra, prsne kosti, grkljana i traheje, radius/lakta, cjevanice, zglobove čašice, ključne kosti, zdjelice, nadlaktice^ nižeg dijela noge, prstiju ruku i nogu, lica i gležnja. Ostale upotrebe uključuju olakšavanje sraščivanja, npr. sraščivanja kralježnice, gležnja i stopala, lakta, kuka i artrodoze kuka, koljena i ramena. Ovdje opisano liječenje s PTHrP analogima je također indikativno zajedno s artroplastičnim postupcima (uključiv reviziju artroplastije) kuka, koljena, ramena/lakta itd. Liječenje kosti može se također pospješiti kod drugih kirurških zahvata, kao što je kirurgija lubanje i maksilofacijalna kirurgija, dentalna kirurgija i bunionektomija. Pokazalo se je da PTHrP analози ubrzavaju liječenje endokondralne kosti (primjeri 1 i 2) koje se odvija preko stvaranja hrskavice, kao i intramembranozne kosti (primjer 3) za koju nije potrebna intermedijarna tvorba hrskavice. Liječenje intramembranozne kosti se praktički može primijeniti u slučajevima gdje je liječenje frakture usporeno, npr. kod dijabetesa, pušača, staraca, anemičnih pacijenata i pacijenata podvrgnutim kortikosteroidima (posebno kod kroničnih glukokortikoida), kroničnog NSAID-a ili imunosupresivne terapije.

- 35 Pojedinačno doziranje PTHrP analoga, potrebno za olakšavanje liječenja prijeloma prema ovom izumu, ovisit će o ozbiljnosti stanja, načinu davanja i sličnim faktorima, o kojima će odlučiti nadležni liječnik. Tipično, doziranje se kreće u području od pribl. 0,01 do 10 µg/kg tjelesne težine dnevno, prednosno od pribl. 0,1 do pribl. 0,5 µg/kg tjelesne težine dnevno. Za osobu tešku 50 kg dnevna doza aktivnog sastojka je od pribl. 0,5 do pribl. 100 µg, prednosno od pribl. 5 do pribl. 10 µg. Ovo doziranje se može dati u uobičajenom farmaceutskom sastavu u jednostrukoj dozi ili se može dati u više navrata ili putem kontroliranog oslobađanja, ako se potrebno postići najučinkovitije rezultate. Doziranje se nastavlja sve dok je medicinski indikativno, što ovisi o ozbiljnosti povrede i može trajati od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci.

- 45 Za razliku od sadašnjih dostupnih metoda za liječenje prijeloma, PTHrP analози se mogu dati sistemski. Tipični režimi davanja uključuju oralno, parenteralno (uključiv subkutano, intramuskularno i intravensko), rektalno, bukalno (uključiv ispod jezika), transdermalno, plućno i intranazalno. Tipični sistemi za plućno i respiratorno davanje su opisani u U.S. patentnu br. 5,607,915. Nazalno davanje PTHrP analoga opisano je u WO 97/07815. U metode liječenja prema ovom izumu također je uključeno sistemsko davanje PTHrP analoga zajedno s lokalnim liječenjem sa sekundarnim sredstvom za liječenje kosti. Tipična sredstva za takovo lokalno davanje uključuju koštane morfogenetske proteine (BMP-2 i BMP-7), osteogenske proteine (OP-1), faktore rasta kao TGF-β i citokine kao IFN-β. Ta se sredstva tipično daju lokalno u različitim nosačima kao što je hidroksi apatit i/ili kalcijev karbonat i amilopektin. Sistemsko davanje PTHrP analoga može se također kombinirati s drugim metodama liječenja prijelom, kao što je mehanička ili biofizička stimulacija, npr. električna ili ultrazvučna stimulacija.

PTHrP analozi daju se tipično kao farmaceutski sastavi u mješavini s farmaceutski prihvatljivim, netoksičnim nosačem. Kako je gore spomenuto, takovi sastavi se mogu pripraviti za parenteralno (subkutano, intramuskularno ili intravensko) davanje, posebno u obliku tekućih otopina ili suspenzija; za oralno ili bukalno davanje, posebno u obliku tableta ili kapsula; za intranazalno davanje, posebno u obliku praška, nazalnih kapljica ili aerosola; i za rektalno ili transdermalno davanje.

Tekuće formulacije za parenteralno davanje kao pomoćne tvari mogu sadržavati sterilnu vodu ili otopinu soli, alkilen glikole kao propilen glikol, polialkilen glikole kao polietilen glikol, ulja biljnog podrijetla, hidrogenirane naftalene i slično. U njima se mogu upotrijebiti slabo kiseli puferi u pH području od pribl. 4 do pribl. 6. Prikladni puferi uključuju acetat, askorbat i citrat u rasponu koncentracija od pribl. 5 mM do pribl. 50 mM. Za oralno davanje formulaciju se može pojačati dodatkom gorke soli ili acilkarnitina. Formulacije za nazalno davanje mogu biti krute i mogu sadržavati pomoćne tvari na primjer laktozu ili dekstran, ili to mogu biti vodene ili uljne otopine koje se upotrebljavaju u obliku nazalnih kapljica ili odmjernog spreja. Pojedinačne nazalne formulacije uključuju suhi prah prikladan za uobičajene inhalatore za suhi prah (DPI), tekuće otopine ili suspenzije prikladne za umagljivanje i formulacije s potisnim sredstvom prikladne za upotrebu u odmjernim dozama inhalatora (MDI). Za bukalno davanje tipične pomoćne tvari uključuju šećere, kalcijev stearat, magnezijev stearat, prethodno želatinirani škrob i slično.

Kog formulacije za nazalno davanje, apsorpciju kroz sluznicu nosne membrane može se poboljšati pomoću površinski aktivnih kiselina kao što je, na primjer, glikoholna kiselina, holna kiselina, tauroholna kiselina, etoholna kiselina, dezoksiholna kiselina, kenodezoksiholna kiselina, dehidroholna kiselina, glikodezoksiholna kiselina, ciklodekstrini i slično, količinom u rasponu između pribl. 0,2 i 15 masenih postotaka, ponajprije između pribl. 0,5 i 4 mas. %, najbolje pribl. 2 mas. %.

Davanje spojeva prema izumu subjektu tijekom produljenog vremenskog perioda, na primjer tijekom perioda od jednog tjedna do jedne godine, može se izvršiti pomoću jednostrukog davanja sistemom za kontrolirano oslobađanje koji sadrži dovoljno aktivnog sastojka za željeni period oslobađanja. U tu svrhu mogu se upotrijebiti razni sistemi kontroliranog oslobađanja, kao što su monolitičke kapsule ili tip kapsula sa spremnikom, depot implantati, osmotske pumpice, vrećice, micle, liposomi, transdermalni flasteri, iontoforetski uređaji i drugačiji oblici doziranja koji se mogu ubrizgati. Lokalizacija na stranu na kojoj se želi isporučiti aktivnu tvar je dodatni oblik nekih uređaja za kontrolirano oslobađanje, koji se mogu pokazati korisnim u liječenju određenih poremećaja.

PRIMJERI

Referentni primjeri

Formulacija za tablete

Slijedeći sastojci se temeljito pomiješaju i isprešaju u -jednostruko zarezane tablete.

Količina	
Sastojak	Tableta, mg
spoj prema izumu	400
kukuruzni škrob	50
kroskarmeloza natrij	25
laktoza	120
magnezijev stearat	5

Formulacija za kapsule

Slijedeći sastojci se temeljito pomiješaju i pune u kapsule od tvrde želatine.

Količina	
Sastojak	Kapsula, mg
spoj prema izumu	200
laktoza sušena raspršivanjem	148
magnezijev stearat	2

Formulacija za suspenziju

Slijedeći sastojci se pomiješaju tako da se dobije suspenzije za oralno davanje.

Sastojak	Količina
spoj prema izumu	1,0 g
fumarna kiselina	0,5 g
natrijev klorid	2,0 g
metil paraben	0,15 g
propil paraben	0,05 g
granulirani šećer	25,5 g
sorbitol (70%-tna otopina)	12,85 g
Veegum K (Vanderbilt Co.)	1,0 g
začini	0,035 ml
bojila	0, 5 mg
destilirana voda	q.s. do 100 ml

Injekcijske otopine

- 5 Slijedeći sastojci se pomiješaju tako da se dobije injekcijsku formulaciju.

Sastojak	Količina
spoj prema izumu	0,2 g
puferska otopina natrijevog acetata	0,4 M, 2,0 ml.
HCl (1N) ili NaOH (1N)	q.s. do odgovarajućeg pH
destilirana voda	q.s. do 20 ml

Nazalna formulacija

Slijedeći sastojci se pomiješaju tako da se dobije suspenziju za nazalno davanje.

Sastojak	Količina
PTHrP analog	20 mg/ml
limunska kiselina	0,2 mg/ml
natrijev citrat	2,6 mg/ml
benzalkonijev klorid	0,2 mg/ml
sorbitol	35 mg/ml
natrijev tauroholat ili glikoholat	10 mg/ml

10 **Primjer 1**

Liječenje defekata segmentiranog prijeloma s PTHrP analozima

Da bi se pokazalo da PTHrP analozi olakšavaju liječenje kosti i popravak frakture primijenjen je modificirani model segmentnog femoralnog defekta na štakoru (T.A. Einhorn et al., J. Bone Joint, 66:274-279 (1984)).

- 15 Odrasli mužjaci štakora Sprague-Dawley težine približno 300 grama držani su na laboratorijskoj dijeti Rodent 5001 (PMI Feeds, St. Luis, MO, USA) s vodom bez ograničenja. 12 sati prije kirurškog zahvata svi štakori su primali samo vodu. Prije zahvata životinje su anestetizirane s IP injekcijom ketamina (80 mg/kg) i ksilazina (5 mg/kg). Za profilaksu protiv infekcije data je intramuskularno jednostruka doza prokain penicilina.

- 20 Primijenjen je lateralni pristup femuru i uzduž prednjeg korteksa femura učvršćena je probušena pločica od polietilena visoke gustoće. Tijekom tog stavljanja obilato oguljen periosteum femura. U srednjem dijelu femura napravljen je segmentni defekt nekritične veličine od 1 mm. Rana je zatvorena s najlonom i kromnim šavovima.

- 25 Postoperativno, štakori su stavljeni u kaveze s pristupom pilulama hrane 48 sati nakon operativnog zahvata. Životinje su promatrane najmanje jednom dnevno i životinje koje su pokazivale bilo kakove znakove bolesti su ispitane i prema potrebi data im je odgovarajuća terapija.

- 30 Štakori su podijeljeni u skupine prikazane u tablici 1 i dat im je kontrolni vehikl (otopina soli) ili PTHrP analog, kao je ovdje opisan, subkutano dnevno počevši prvog dana nakon operacije. Radiografske analize radene su tjedno. Životinje su žrtvovane nakon 6 tjedana i uspoređene radiografski.

Umireni štakori stavljeni su portbuše pri čemu im je stražnji bio ud zakrenut prema van. Svaki tjedan, počevši od prvog tjedna nakon operacije, napravljen je niz radiografa svakog femura (uključiv femur i kontralateralni femur). U svaki

radiograf zbog baždarenja je uključen aluminijski fantomski uređaj s poznatim vrijednostima gustoće. Svaki radiograf je stavljen na transluminacijsku ploču i snimljen s digitalnom kamerom Kodak DCS 420. Te slike su zatim prenešene u IBM kompatibilno računalo Gateway 2000 i digitalizirane pomoću računalnog programa (Sigma Scan®) za analizu slika. Nacrtan je obris defekta i prosječna gustoća u području osteotomije izmjerena je u liječenim životinjama i uspoređena s kontrolnim životinjama. Slika 1 prikazuje povećanje gustoće kosti na mjestu osteotomije u liječenim životinjama u usporedbi s kontrolnim životinjama u tjednim intervalima kroz prvih pet tjedana liječenja. Prosječna gustoća osteotomije također je uspoređena s prosječnom gustoćom kontralateralnog femura za svaki tjedan očitavanja. Slika 2 prikazuje radiograpički omjer gustoće nakon 6 tjedana. Usporedba tih gustoća kosti pokazuje da PTHrP analozi imaju učinak liječenja kosti. Nakon žrtvovanja (6 tjedana) femuri (eksperimentalni i kontrolni) su izvađeni iz mekog tkiva. U lateralnoj ravnini uzeti su sitno zrnati radiogrami. Osteotomija se je smatrala srašćenom kad je neprekinuta okoštanoost femura bila veća od 25% promjera poprečnog presjeka defekta. Usporedba femura kod liječenih životinja s kontrolnim životinjama pokazuje da PTHrP analozi ubrzavaju liječenje kosti i popravak prijeloma. Slika 3 prikazuje tipičan radiograf kontrolnih (slika 1A) i liječenih (slika 1B) životinja.

Tablica 1

Skupina	Spoj	Davanje	Broj životinja	Žrtvovanje nakon
1	kontrola	subkutano	10	6 tjedana
2	PTHrP analog B	subkutano	10	6 tjedana
3	PTHrP analog C	subkutano	10	6 tjedana

Primjer 2

Liječenje kosti s PTHrP analogima u modelu defekta zatvorenog prijeloma

Primijenjen je model zatvorenog prijeloma po Bonnarens/Einhornu (F. Bonnarens i T.A. Einhorn, J. Orthopaedic Research, 2:97-101 (1984)). Štakori su upotrijebljeni kao u primjeru 1. U tom modelu intramedularna šipka stavljena je retrogradno kroz distalni femur pristupom preko središnjeg oslonca. Zatim je artrotomija zatvorena šavom koji se ne može resorbirati i intramedularna šipka je stavljena na mjesto. Zatim je, na uobičajen način, pomoću stezne naprave u tri točke, napravljen zatvoren poprečni prijelom. Životinje su promatrane i analiza radiografa učinjena je kao u primjeru 1. U ovom modelu, kod liječenih životinja uspoređenih s kontrolnim životinjama, PTHrP analozi ubrzavaju liječenje kosti i popravak prijeloma.

Primjer 3

Intramembranozno liječenje kosti s PTHrP analogima

Zečevima su bili pod općom anestezijom i podvrgnuti kirurškom zahvatu kojim su napravljena četiri površinska defekta, po jedan u svakom distalnom femuru i po jedan u svakoj proksimalnoj cjevanici. Bočni rez nakon kirurškog zahvata, veličine približno 3 cm, učinjen je tako da otkriva distalnu lateralnu femoralnu kondilu. Kost blizu spoja u koljenu otkrivena je ispod pokosnice i probušena je rupica od 5 mm, pri čemu se je oštrica svrdla hladila stalnim kvašenjem. Rana je zalijevana s normalnom otopinom soli. Duboko tkivo je zatvoreno s neprekinutim 3-0 trajnim šavom i zatim zatvaranjem subikularnog sloja s neprekinutim 3-0 najlonskim šavom i tri do četiri puta s prekinutim šavom od nerđajućeg čelika. Drugi rez od 3 cm učinjen je iznad sredine proksimalne cjevanice i rupica od 5 mm probušena je u proksimalnoj medijalnoj cjevanici. Rana je zatvorena kako je prethodno opisano. Ovaj postupak ponovljen je na kontralateralnom limbu.

Zalihe otopina PTHrP analoga C,

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹His²⁶hPTHrP(1-34)NH₂, i PTHrP analoga D,

(MAP₁₋₁₀)²²⁻³¹hPTHrP(1-34)NH₂, koncentracije 800 µg/ml, pripravljene su sterilnom filtracijom kroz filter od 0,22 mikrona i neposredno prije davanja razrijeđene su s vehiklom na 20 µg/ml i na 100 µg/ml. Vehikl je bio 30 mg/ml manitola, 30 mg/ml saharoze, 0,12 mg/ml TweenaTM 80, 0,17 mg/ml octene kiseline i 2,33 mg/ml natrijevog acetat trihidrata. PTHrP analozi dati su kirurški obrađenim životinjama potkožnom injekcijom količinom od 2 µg/kg/dnevno ili 10 µg/ml dnevno.

Tijekom proučavanja životinje su svaki tjedan snimane pomoću X zraka. Denzitometrijska mjerenja provedena su pomoću transluminacijskog pretražnog uređaja i računalnog programa MetaMorfTM (Universal Imaging, West Chester, PA). Radiografi nižih ekstremiteta napravljeni su u unutarnjoj i vanjskoj rotaciji desetog i dvadesetprvog dana nakon operacije. Životinje su žrtvovane tridesetog dana nakon operacije. Na kraju proučavanja životinje su usmrćene prekomjernom dozom pentobarbitola, tkivo je skinuto s lijevog i desnog femura, a goljenice su analizirane pomoću X zraka i histološkom analizom.

Životinje liječene s PTHrP analogom C i D pokazale su ubrzano stvaranje intramembranozne kosti u usporedbi sa životinjama koje su liječene s vehiklom. Rezultati za PTHrP analog D prikazani su na slikama 4A i 4B za femur i cjevanicu. Dvadesetprvog dana izlječenje nije bilo potpuno za femoralni, niti za defekt cjevanice kod kontrolno liječenih životinja, dok je 40% femoralnih i defekata cjevanice bilo izliječeno u skupini koja je primila nisku dozu. Istovremeno,

75% defekata goljenice i 50% femoralnih defekata izliječeno je u skupini visoke doze. Nakon žrtvovanja, radiografska analiza potvrdila je poboljšano liječenje kod životinja liječenih s PTHrP analogima, pri čemu je više od 85% defekata goljenice kod visoke doze bilo ispunjeno s mineraliziranim tkivom, dok je manje od 10% kontrolnih defekata goljenice bilo ispunjeno kod žrtvovanih kontrolnih životinja ($p<0,01$). Slično, značajno veći postotak popunjenosti bio je kod femoralnih defekata liječenih s PTHrP nego kod kontrolno liječenih femoralnih defekata ($p<0,01$).

Primjer 4

Poboljšano liječenje kosti u modelu osteotomije lakatne kosti

Svrha ovog pokusa bila je pokazati da PTHrP analozi mogu povećati biomehaničku čvrstoću (I dio) i kinetiku liječenja (II dio) u kontekstu sistemske terapije s kortikosteroidima u modelu osteotomije na zečevima.

U svim pokusima korišteni su odrasli mužjaci zečeva New Zeland White. U I dijelu deset zečeva je podijeljeno u dvije jednake skupine, a u II dijelu jednako je podijeljeno dvadeset zečeva. Defekti veličine, koja nije bila kritična (1 mm), napravljeni su bilateralno na svakom zecu. Dva mjeseca prije kirurškog zahvata, pa sve do šest tjedana nakon operacije, svi zečevi su dobivali potkožne injekcije prednisona (0,15 mg/kg) u sterilnoj vodi (eksperimentalna skupina) ili sterilnu otopinu soli (kontrolna skupina). Počevši od prvog dana nakon operacije, pokusna skupina je primala dnevno potkožne injekcije PTHrP analoga D (0,01 mg/kg), dok je kontrolna skupina primala injekcije normalne otopine soli. U I dijelu životinje su žrtvovane šest tjedana nakon stvaranja osteotomije. U II dijelu životinje su žrtvovane kad je radiografski spoj dosegao obje strane, ili u slučaju nesraščivanja deset tjedana nakon operacije.

u obje skupine pokusa, radiološki intenzitet i područje izlječenja analizirano je svaki drugi tjedan počevši dva tjedna (I dio) ili četiri tjedna (II dio) nakon operacije. Napravljeni su nizovi radiografa prednjeg limba i digitalizirani, a područje kosti kvantificirano je pomoću računalnog programa za analizu slike (Sigma Scan Pro). Fotodenzitometrija je korištena za kvantifikaciju sadržaja minerala u novo nastaloj kosti na stranama osteopatije i u nastalom kalusu. Nakon žrtvovanja napravljeni su faksitronski radiografi visoke rezolucije za obadva limba u anteroposteriornj i lateralnoj ravnini, koja omogućuje analizu dimenzija i veličine kalusa prijeloma.

Rezultati (I dio)

Za šest tjedana srašćivanje limba je postignuto u devet od deset životinja liječenih s PTHrP analogom D, dok su kod kontrolnih životinja liječenih s vehiklom postignuta srašćivanja samo kod dvije od deset životinja. Ti rezultati su prikazani na slici 5. Nakon šest tjedana anteroposterorni i lateralni faksitroni otkrili su značajno veće intenzitete na stranama osteotomije liječenih u usporedbi s kontrolnim limbovima. Slično, intenzitet proksimalnih i distalnih lakatnih diafiza bili su značajno veći kod liječenih limbova. Lateralno, intenzitet vanjskih kalusa također je bio veći kod liječenih limbova. Biomehanički, torziona čvrstoća liječenih limbova bila je značajno veća nego kod kontrolnih limbova liječenih vehiklom i to kako izražena čvrstoćom, tako također i prema maksimalnoj torziji. Rezultati (II dio)

Nakon 4 tjedna liječeni limbovi pokazali su veći radiografski intenzitet nego kontrolni limbovi na strani osteopatije ($p<0,01$) kao i u vanjskom kalusu i lakatnim diafizama. Područja srašćenih kalusa liječenih limbova bila su veća ($p<0,05$) i tu je opažen trend koji je pokazivao da se je smanjivala veličina strane osteotomije. Nakon šest tjedana, radiografija in vivo pokazala je trend povećanog intenziteta na strani osteotomije liječenih limbova u usporedbi s kontrolnim limbovima, iako nikakve razlike nisu opažene u intenzitetu ili području kalusa. Radiografski, svi limbovi liječeni s PTHrP analogom bili su obrađeni kao srašćeni i sve su te životinje žrtvovane nakon 6 tjedana. Nakon 8 tjedana četiri dodatna limba (dvije životinje) dosegle su radiografsko spajanje i bile su žrtvovane. Nakon 10 tjedana žrtvovane su preostale životinje, jer su ti limbovi pokazali da nema progresije što se tiče liječenja po isteku perioda od 4 tjedna i stoga su bili klasificirani kao nesrašćeni. Limbovi liječeni s PTHrP analogom pokazali su veći radiografski intenzitet na strani osteotomije ($p<0,05$) kao i na lakatnoj diafizi i području ožiljka. Područje osteotomije bilo je značajno manje u limbovima liječenim s PTHrP analogom nego u kontrolnim limbovima liječenim s vehiklom. Stoga dakle u ovom modelu usporenog liječenja induciranog s kortikosteroidom, liječenje s PTHrP analogom ima za posljedicu potpuno srašćivanje za 6 tjedana, dok nakon 10 tjedana 75% neliječenih limbova ne pokazuje nikakvu tendenciju srašćivanja.

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Metoda za liječenje kostiju i popravak prijelom, **naznačen time**, da uključuju davanje učinkovite količine polipeptidnog analoga paratiroidnom hormonu srodnog peptida (PTHrP) i njegovih soli pacijentu kojem je to potrebno, u kojem polipeptidu ostaci amino kiselina 22-31 oblikuju amfipatsku α -uzvojnicu.
2. Upotreba polipeptidnog analoga paratiroidnom hormonu srodnog peptida (PTHrP) i njegovih soli u, pri čemu ostaci amino kiselina 22-31 spomenutog PTHrP analoga oblikuju amfipatsku α -uzvojnicu, **naznačena time**, da se on koristi za proizvodnju lijeka za liječenje kostiju i popravak prijeloma.
3. Metoda prema zahtjevu 1 ili upotreba prema zahtjevu 2, **naznačena time**, da se PTHrP analog daje nazalno.
4. Metoda prema zahtjevu 1 ili upotreba prema zahtjevu 2, **naznačena time**, da nadalje uključuje lokalnu aplikaciju drugog sredstva na frakturu za liječenje kosti.

5. Metoda prema zahtjevu 1 ili upotreba prema zahtjevu 2, **naznačena time**, da se radi o prijelomu u intramembranoznoj kosti.
6. Metoda prema zahtjevu 1 ili upotreba prema zahtjevu 2, **naznačena time**, da se PTHrP analog daje sistemski.
7. Metoda prema bilo kojem zahtjevu od 1 ili 3 do 6 ili upotreba prema zahtjevu 2 ili bilo kojem zahtjevu 3 do 6, **naznačena time**, da je amfipatska α -uzvojnica

Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu

pri čemu Xaa je ostatak amino kiseline s pozitivnim nabojem.

8. Metoda ili upotreba prema zahtjevu 7, **naznačena time**, da Xaa je lizin ili histidin.
9. Metoda ili upotreba prema zahtjevu 8, **naznačena time**, da je PTHrP analog

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

ili

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

10. Metoda ili upotreba prema zahtjevu 7, **naznačena time**, da PTHrP analog ima najmanje dva ostatka amino kiselina međusobno povezane preko njihovih bočnih lanaca.
11. Metoda ili upotreba prema zahtjevu 10, **naznačena time**, da se povezani ostaci amino kiselina nalaze u položajima 13 i 17 ili u položajima 26 i 30.
12. Metoda ili upotreba prema zahtjevu 11, **naznačena time**, da je ostatak amino kiseline u položaju 17 aspartinska kiselina.
13. Metoda ili upotreba prema zahtjevu 12, **naznačena time**, da PTHrP analozi jesu

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)

ili

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).

14. Metoda prema bilo kojem zahtjevu od 1 ili 3 do 6 ili upotreba prema zahtjevu 2 ili bilo kojem zahtjevu od 3 do 6, **naznačena time**, da je PTHrP analog N-terminalno skraćeni analog od 30 do 50 ostataka amino kiselina proizvoljno supstituiranih na položajima 5, 13, 17, 19, 26, 30, 32 i/ili 34.
15. Metoda ili upotreba prema zahtjevu 14, **naznačena time**, da je PTHrP analog:

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

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),

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 IleGln Asp Leu Arg
Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr D-Orn
lactam(SEQ ID NO:10),

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser IleGln Asp Leu Arg
Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr hSer lactam(SEQ
ID NO:11)

ili

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser IleGln 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).

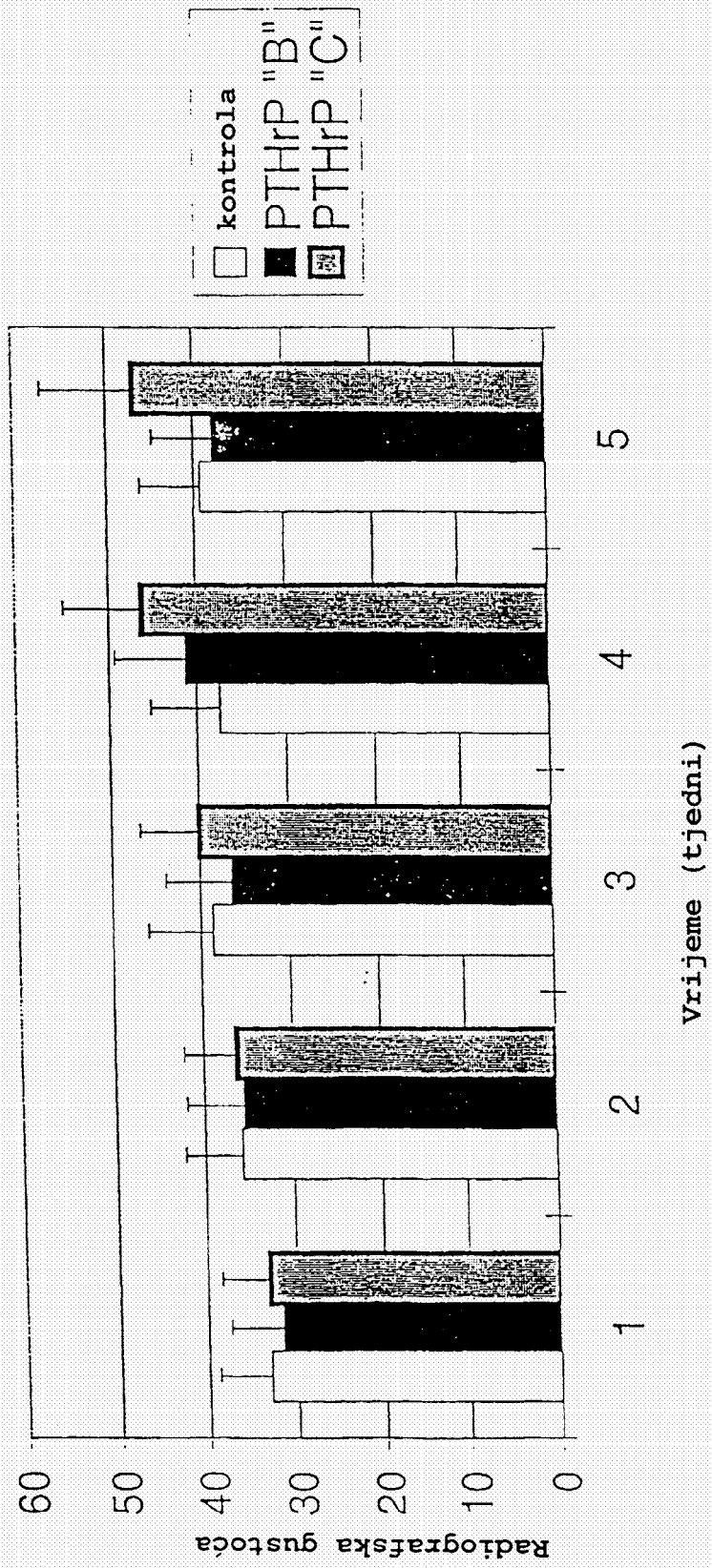
5

SAŽETAK

10 Predloženim izumom date su metode za liječenje kostiju i popravak prijeloma koje uključuju davanje učinkovite količine polipeptidnog analoga paratiroidnom hormonu srodnog peptida (PTHrP) i njegovih soli pacijentu kojem je to potrebno, u kojem polipeptidu ostaci amino kiselina 22-31 oblikuju amfipatsku α -uzvojnica, ili upotrebu takovih polipeptida za pripravljanje lijeka za liječenje kostiju i popravak prijeloma.

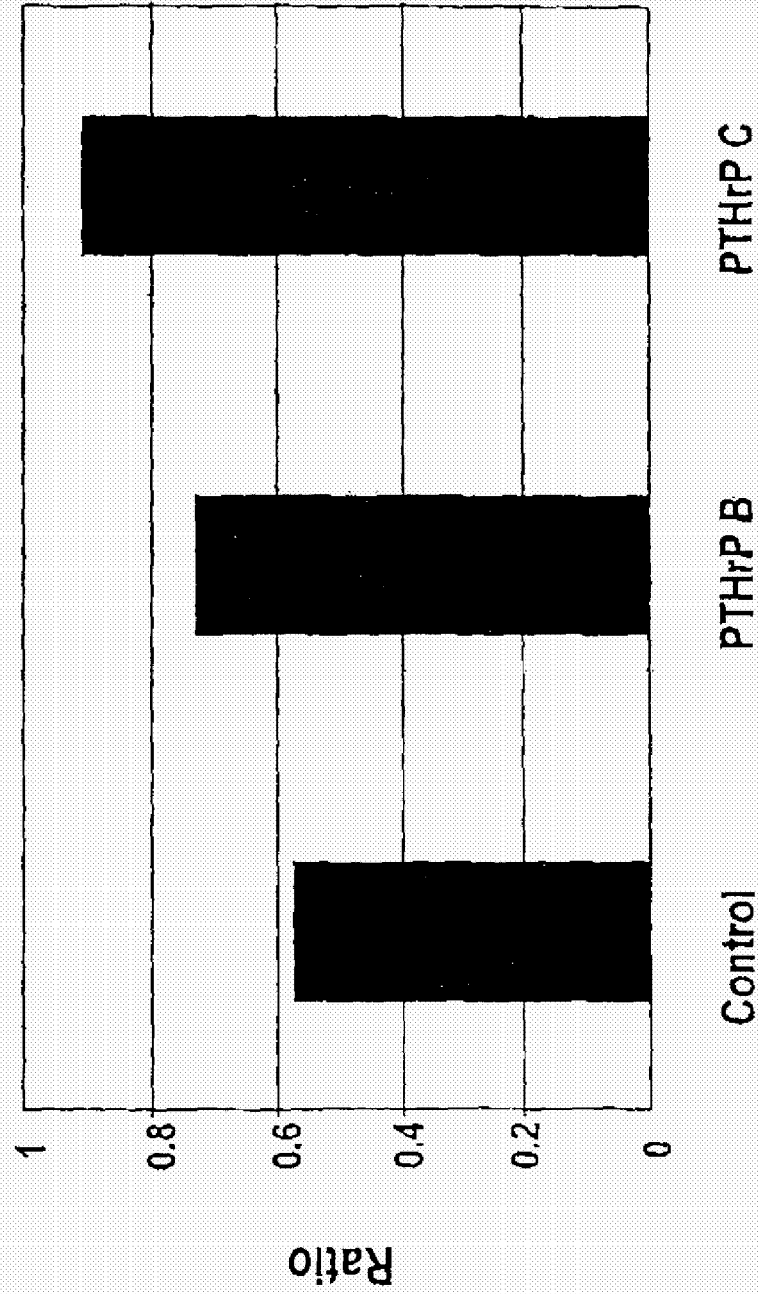
Slika 1

Proučavanje PTHrP - defekt



Slika 2

Radiographic Density Ratio -Defect/Contralateral



Tjedan 6

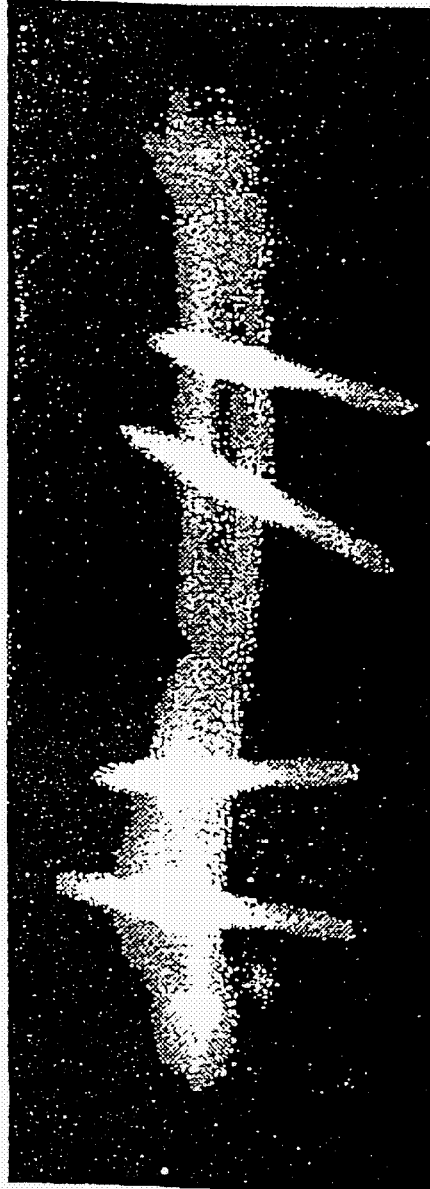
Slika 3a

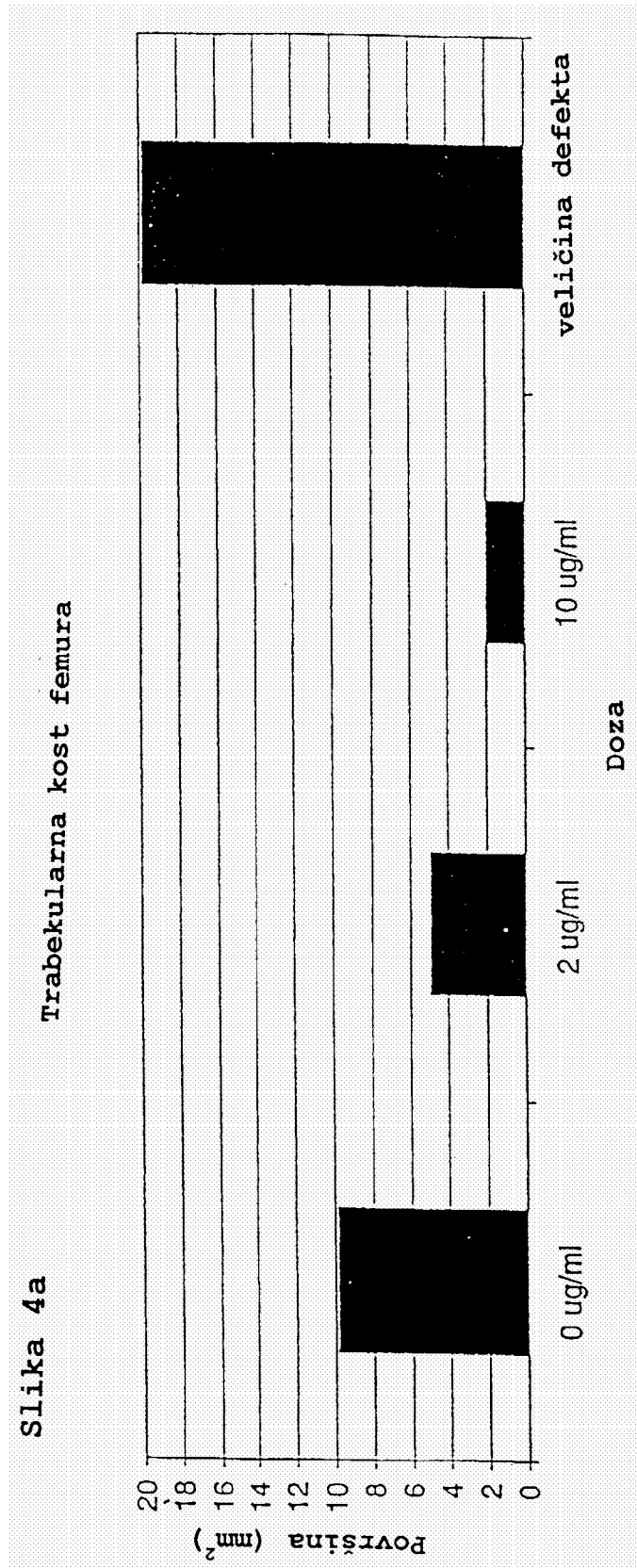
Primjer radiografa visoke rezolucije nesraštenog defekta nakon 6 tjedana

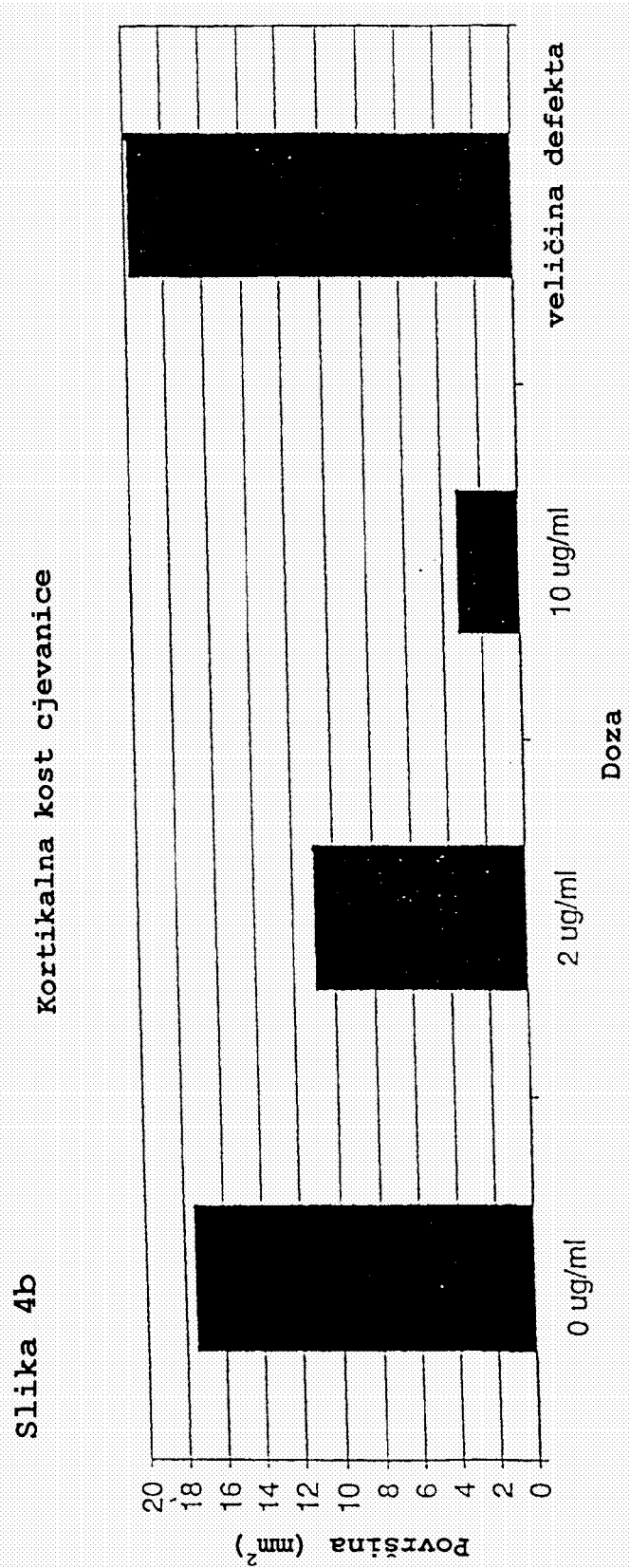


Slika 3b

Primjer radiografa visoke rezolucije izliječenog defekta nakon 6 tjedana







Brzina srašćivanja nakon 6 tjedana

Slika 5

