

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) **PI9711002-7 B1**

(22) Data de Depósito: 01/08/1997
(45) Data da Concessão: 06/09/2011
(RPI 2122)



(51) *Int.Cl.*:
C07K 14/635

(54) Título: **ANÁLOGO DO HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE PARA O TRATAMENTO DE OSTEOPOROSE.**

(30) Prioridade Unionista: 02/08/1996 US 08/691.647, 14/03/1997 US 60/040.560

(73) Titular(es): National Research Council of Canada

(72) Inventor(es): Gordon E. Willick, James Whitfield, Jean-René Barbier, Paul Morley, Virginia Ross, Witold Neugebauer

ANÁLOGO DO HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE PARA O TRATAMENTO DE OSTEOPOROSE

Campo da Invenção

5 Este invento se relaciona a análogos do hormônio da paratireóide humana que têm sido identificados como efetivos no tratamento da osteoporose.

Conhecimento do Invento

A osteoporose é uma das causas que leva à incapacidade nos idosos, em particular as senhoras. Descobriu-se recentemente que o
10 hormônio da paratireóide humana (hTPH) e certos análogos estimulam o crescimento do osso que é útil no tratamento da osteoporose. A osteoporose é uma doença progressiva cujo resultado é a redução da massa total do osso e sua crescente fragilidade. Isto geralmente resulta em fraturas espontâneas dos ossos de sustentação e o enfraquecimento físico e mental
15 característicos das doenças que imobilizam. A osteoporose pós-menopausa é causada devido ao desaparecimento do estrogênio que desencadeia uma aceleração de uma década de duração do "turnover" ósseo com um crescente desequilíbrio entre a reabsorção do osso velho e a formação do novo. Isto resulta num adelgaçamento, aumento da porosidade , e depleção
20 trabecular dos ossos de sustentação. A osteoporose é também associada ao hipertireoidismo, hiperparatireoidismo, síndrome de Cushing, e o uso de certas drogas esteróides. Historicamente a cura tem envolvido o aumento da dieta de cálcio, estrogênio-terapia, e grandes doses de vitamina D, mas principalmente com agentes como antireabsorptivos que inibem a reabsorção
25 do osso pelos osteoclastos.

O hormônio da paratireóide (PTH) é produzido pela glândula paratireóide e é o principal regulador dos níveis de cálcio no sangue. PTH é um polipeptídeo e polipeptídeos sintéticos podem ser preparados pelo método descrito por Erickson and Merrifield, *The Proteins*, Neurath et al., Eds Academic Press, New York, 1976, pag 257, e modificado pelo método de Hodges et al (1988) *Peptide Research* 1, 19 ou por Atherton, E. And Sheppard, R.C. *Solid Phase Peptide Synthesis*, IRL Press, Oxford, 1989.

Quando o cálcio sérico é reduzido a nível abaixo do normal, a glandula paratireóide libera PTH e o nível de cálcio aumenta pela reabsorção do cálcio ósseo, pelo aumento da absorção do cálcio do intestino e do cálcio da urina nos túbulos renais. Embora baixos níveis de PTH continuamente infundidos possam remover o cálcio do osso, as mesmas baixas doses quando injetadas intermitentemente podem efetivamente promover o crescimento ósseo.

Tregear, U.S. Patent 4.086.196, descreveu análogos do PTH humano e afirmou que os primeiros 27 a 34 aminoácidos são os mais efetivos em termos de estimulação da adenililciclase em ensaios em células e in vitro. Rosenblat, U.S. patent 4.771.124, descobriu a propriedade dos análogos do hPTH em que Trp²³ é substituído pelos aminoácidos fenilalanina, leucina norleucina, valina, tirosina, β -naptilalanina, ou α -naptilalanina como um antagonista do PTH. Estes análogos modificados do PTH têm também os aminoácidos terminais 2 e 6 removidos, resultando em perda da maior parte da atividade combativa quando usado no tratamento da osteoporose. Estes análogos foram designados como inibidores do PTH e peptídeos PTH-relacionados. Os análogos foram requeridos como possivelmente úteis no tratamento da hipercalcemia associada a certos

tumores.

Pang et al., WO93/06845, publicação em 15 de abril de 1993, descreveram análogos do hPTH que envolve substituições de Arg²⁵, Lys²⁶, Lys²⁷ com numerosos aminoácidos, incluindo alanina, asparagina, ác. aspártico, cisteína, glutamina, ác. glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, trionina, triptofânio, tirosina ou valina. Estes são descritos, sem dados de sustentação de provas em animais ou humanos, de ser efetivos no tratamento da osteoporose com efeitos mínimos na pressão sanguínea e musculatura lisa.

O PTH age através da ativação de 2 sistemas mensageiros secundários, adenililciclase G_s-proteína ativada(AC) e fosfolipase G_q-proteína ativada C_β. A última resulta numa estimulação da atividade da proteino-quinase Cs(PKC) de superfície de membrana. A atividade da PKC tem sido mostrada em requerer resíduos 29 ao 32 do PTH (Jouishomme et al (1994) J. Bone Mineral Res.9, (1179-1189). Tem sido estabelecido que um aumento do crescimento do osso, isto é, aquele efeito que é útil no tratamento da osteoporose, é ligado à habilidade da sequência de peptídio em aumentar a atividade de AC. A sequência nativa do PTH tem sido apontada em ter todas estas atividades. A sequência do hPTH-(1-34) é tipicamente mostrada como(A):

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu
Gln Asp Val His Asn Phe-OH

A

O análogo linear a seguir, hPTH-(1-31)-NH₂, cujos dados estão incluídos na Tabela 1 abaixo, tem só atividade AC-estimuladora e tem sido

descrita como sendo completamente ativa na restauração do dano ósseo em
 rata modelo ovariectomizada (ooforectomizada=OOP) (Rixon, R.H et al
 (1994) J. Bone Miner. Res. **9**, 1179-1189; Whitfield et al (1996), Calcified
 Tissue Int. **58**, 81-87; Willick et al, U.S. Patent No.5.556.940 publicada em 17
 5 de setembro de 1996):

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His
 Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu
 Gln Asp Val-NH₂

B

10 A molécula acima , **B**, pode ter um final carboxil livre no lugar
 do final amida ilustrado.

É uma finalidade da presente invenção produzir novos
 análogos do PTH com estabilidade metabólica maior, atividade de
 restauração óssea aumentada, atividade AC aumentada e mínimos efeitos
 15 colaterais clínicos.

Breve Sumário da Invenção

De acordo com um dos aspectos da invenção, o hormônio
 humano da paratireóide hPTH e os sais aceitáveis farmacologicamente daí
 provenientes, tendo a sequência de aminoácidos.

20 R-NH-R1-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-R2-His-Asn-Leu-Gly-Lys-R3-R4-R5-R6-
 R7-Glu-Arg-Val-R8-Trp-Leu-R9-R10-R11-Leu-R12-Asp-Y

em que,

R= hidrogênio ou qualquer cadeia linear ou ramificada do grupo alquil, acil
 ou aril,

25 R1= Ser, Ala ou Aib,

R2= Met, ou aminoácido hidrofóbico naturalmente obtido,

R3= His ou aminoácido solúvel em água,

R4= Leu ou aminoácido hidrossolúvel,

R5= Asn ou aminoácido hidrossolúvel,

R6= Ser ou aminoácido hidrossolúvel,

5 R7= Met, ou aminoácido hidrofóbico naturalmente obtido,

R8= Glu, Lys ou Asp,

R9= Cys, Glu ou Orn,

R10= Arg, Lys, Orn, Gln, Glu ou Asp,

R11= um aminoácido polar ou hidrofóbico naturalmente obtido,

10 R12= Gln, Arg, Glu, Asp Lys ou Orn,

X= OH, NH₂, e

Y= X, Val-X, Val-His-X, Val-His-Asn-X, Val-His-Asn-Phe-X, Val-His-Asn-Phe-

Val-X, Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-X e Val-His-Asn-Phe-Val-Ala-Leu-X,

ciclizado como entre um ou dois pares de aminoácidos 22 e 26, 26 e 30, e

15 27 e 30, e 25 e 29 quando R3 e R6 são Lys, Orn, Glu, ou Asp, excluindo

ciclo (Lys²⁶-Asp³⁰)[Leu²⁷]-hPTH-(1-34)-NH₂, ciclo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-34)-NH₂ e ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)-[Leu²⁷]-hPTH-(1-34)-OH.

Exemplos de sais incluem sais de ácidos inorgânicos, sais de ácidos orgânicos tais como ácido fórmico, ácido acético, ácido tartárico e
20 ácido cítrico, sais de bases inorgânicas tais como sódio e amônio e sais de bases orgânicas como trietilamina, etilamina e metilamina.

De acordo com outra característica da presente invenção, a ciclização é efetuada pela formação de lactams, envolvendo a ligação das cadeias laterais dos pares dos aminoácidos selecionados como entre os
25 resíduos naturais 22 e 26, ou 26 e 30. Outros tipos de ciclizações, tais como a formação da ponte dissulfídica por exemplo entre Cys tendo análogos

Cys²²-Cys²⁶ e Cys²⁶-Cys³⁰ são também contempladas.

Substituições de vários aminoácidos têm também sido achados efetivos. Lys²⁷ pode ser substituída por uma Leu ou por vários outros resíduos polares ou hidrofóbicos naturalmente ocorridos. Outro fator é quão bem o resíduo se adequa ao receptor. Ala não é tão hidrofóbica como a Leu. Lys e Tyr geralmente são considerados por ser polares, mas não obstante têm interações com o receptor. Lys, por exemplo, pode dobrar tanto que a parte hidrofóbica interage com outros resíduos hidrofóbicos no receptor, e o NH₂ é exposto ao solvente. Tais substituições incluem ornitina, citrulina, ácido α -aminobutírico, alanina, norleucina, isoleucina e tirosina, ou qualquer ácido α -aminoalifático linear ou ramificado, tendo 2-10 carbonos na cadeia lateral, qualquer tipo análogo tendo grupo polar ou carregado no término da cadeia alifática. Exemplos de grupos polares ou carregados incluem; amino, carboxil, acetamido, guanido e ureido. Embora pareça que Leu²⁷ é a melhor substituição, também parece que muitas outras substituições pós²⁷ detêm atividade quase total e podem também ter as propriedades desejadas, tais como estabilidade proteolítica aumentada ou solubilidade em água, Ile, norleucina, Met, e ornitina são esperados como sendo os mais ativos.

Esta substituição resulta na estabilização duma α -hélice na região de ligação do receptor do hormônio. Isto tem sido confirmado pelo exame do espectro de dicroísmo circular dos análogos lactan, comparados ao espectro de dicroísmo circular da molécula linear, [Leu²⁷]-hPTH-(1-31)-NH₂. Espectros de dicroísmo circular são mais altamente sensíveis à presença da estrutura secundária α - helicoidal, e a técnica tem sido usada para demonstrar a presença da α - hélice nos fragmentos hPTH (Neugebauer et al (1991) *Biochemistry* **31** , 2056-2063). Além disso, a estabilização da α -

hélice na formação dos acima mencionados lactans no hPTH-(20-34)-NH₂ tem sido mostrados (Neugebauer et al (1994) *Int. J. Protein Peptide Res.* **43**, 555-562). Há uma α - hélice anfifílica potencial entre os resíduos 21 e 31 do hPTH-(1-31)-NH₂ , e tem sido apresentados dados mostrando que a face

5 hidrofóbica desta hélice interage com o receptor PTH (Neugebauer, W. (1995) et al *Biochemistry* **34**, 8835-8842; Gardella, T. J. et al (1993), *Endocrinology* **132**, 2024-2030).

Tem sido encontrado que a ciclização mais efetiva envolve a formação de um lactan, por exemplo, ou entre os resíduos Glu²² e Lys²⁶, ou

10 Lys²⁶ e Asp³⁰. Outras ciclizações são possíveis também tais como entre Lys²⁷ e Asp³⁰, contudo este lactan tem sido achado como exibindo algum efeito desestabilizante na α - hélice.

Mais especificamente, estudos na ligação de receptor dos fragmentos do PTH tem indicado uma região de ligação principal entre os

15 resíduos 14-34 ¹ . Nós temos sugerido que os resíduos 17-29 α - hélice ligam-se como tal ao receptor do PTH, e que a porção anfifílica desta α - hélice liga-se com sua face hidrofóbica ao receptor ² . Este modelo é compatível com os resultados de um estudo das regiões de ligação receptoras análogas ³ .

20 Estudos da RNM tem mostrado que mesmo um peptídeo modelo considerado como sendo altamente helicoidal pelo DC também povoam muitas conformações não helicoidais. Assim a estrutura de um hormônio peptídeo receptor de ligação como o PTH, não pode ser inferido com segurança a partir de sua estrutura livre em solução. Análogos restritos

25 dos hormônios peptídeos tem sido usados para limitar o número de estados conformacionais disponíveis para o peptídeo ⁸ . O exame da sequência do

hPTH revela três pontes salinas possíveis dentro dos resíduos 17-29 que podem tanto estabilizar ou desestabilizar a α -hélice. Estas são entre Glu²² e Lys²⁶, e Lys²⁶ e Asp³⁰, ambos dos quais espera-se que estabilizem a α -hélice, e entre Lys²⁷ e Asp³⁰, é esperado que desestabilize uma α -hélice ⁴

5 A formação de lactan entre estes pares de resíduos deveria restringir as conformações viáveis para hPTH nesta região helicoidal. Além disso, dois destes lactans, Glu²²-Lys²⁶ e Lys²⁶-Asp³⁰ cujos espera-se que estabilizem a estrutura α -helicoidal estão localizados na face polar da porção anfifílica da α -hélice. Do terceiro, Lys²⁷-Asp³⁰ espera-se que pelo menos desestabilize
10 parcialmente a α -hélice e envolva o resíduo, Lys²⁷, que está na face hidrofóbica da hélice anfifílica. A ciclização como entre as posições 25 e 29 pode ocorrer também se Lys ou Orn substituir Arg na posição 25 e se Gln²⁹ é substituída com Glu ou Asp.

A substituição de Leu por Lys²⁷ resulta num resíduo mais
15 hidrofóbico na face hidrofóbica da hélice anfifílica. Isto resulta em aumento de atividade estimulante da adenilil ciclase na linhagem celular ROS. Será estimado pelos especializados na arte que outras tais substituições discutidas acima poderiam provavelmente resultar em análogos com atividades iguais ou aumentadas.

20 O efeito combinado da substituição e também formação de lactan é esperado que estabilize a α -hélice e aumente a bioatividade, e proteja esta região da molécula duma degradação proteolítica. A presença da amida no C-terminal é preferida no sentido que é posteriormente esperado proteger o peptídeo contra degradação exoproteolítica, apesar de
25 que algumas peptidases possam hidrolizá-los. (Leslie, F. M. and Goldstein, A. (19982) *Neuropeptides* 2, 185-196).

Também ficou conhecido que outras substituições de aminoácidos podem ser utilmente feitas. Especificamente, temos substituído o resíduo sensível à oxidação Met nas posições 8, 18 com o resíduo hidrofóbico naturalmente surgido, Nle pela patente japonesa publicação 61-24598. É também esperado que outros resíduos hidrofóbicos como Leu, Ile, Val, Phe e Trp também poderiam ser úteis, como pela USP 5.393.869 por Nakagawa et al.

Lactans invertidos são também ponderados. Por exemplo, mostramos a eficácia da troca de Lys²²-Glu²⁶. Por consequência é esperado que trocas similares podem ser utilmente feitas como entre os lactans 26-30 e 27-30.

Outra substituição no preferido local 22-26 do lactan, em adição do supracitado Cys-Cys, isto é, Asp²²-Orn²⁶ tem sido feito para ilustrar que diferentes tamanhos de ciclização/anel podem ser feitos utilmente.

No USP 5.393.869 Nakagawa et al e USP 5.434.246 Fukuda et al alguns análogos hPTH substituídos foram mencionados como tendo essencial atividade AC e poderiam ter estabilidade elevada ao ataque proteolítico, especificamente,

1. Ser-1 para Aib (ácido α -aminoisobutírico)
2. Lys-27 para Gln (citada como tendo 2,5X atividade AC).
3. Resíduos 14,15,16,17 para Lys, no todo ou em partes disse que teve a atividade muito aumentada- até 8x. Isto pode ser devido ao aumento da solubilidade em água. *In vivo*, é esperado que sejam mais lábeis para enzimas tipo tripsina. Alegam que este tetrapeptídio (resíduos 14-17, incl.) tal que haja pelo menos um aminoácido hidrossolúvel. Por exemplo

His-14 ou Lys-14; Leu-15, Lys-15 ou Arg-15; Asn-16, Orn-16, Hci (homocitrulina)-16, Asp-16, Arg-16, Lys-16, DLys-16, Ser-16 ou Gly-16, e 17-Ser, 17-Lys, 17-Asp ou 17-Arg. Também pode incluir Glu, por exemplo.

4. Arg 25 para His para minimizar o ataque de protease.

5 Desde nossos lactans, particularmente com Leu ou outro aminoácido hidrofóbico na posição-27, pode tornar-se um pouco insolúvel a também difícil para dissolver, poderia ser esperado que as mesmas substituições poderiam ser úteis em nossos lactans.

Será também apreciado pelos peritos na arte que embora os
10 cíclicos 1-31 h-PTH possam ser preferidos, é para ser esperado, pelos dados apresentados aqui, que os fragmentos cíclicos na ordem de 1-30 a 1-37 também serão efetivos. Em particular, não há evidência na literatura que a presença de aminoácido adicional acima do 37 afete as propriedades biológicas do hormônio, particularmente fornecido nos dados confirmatórios
15 1-34 aqui incluídos.

Os lactans de acordo com o invento podem ser preparados pelos procedimentos conhecidos descritos abaixo, e podem ser usados para estimulação do crescimento ósseo, por ossos em restabelecimento, e para a promoção da cura óssea em várias circunstâncias, tais como a osteoporose
20 e fraturas normais.

Descrição Breve das Ilustrações

Fig. 1 mostra a estrutura do PTH humano natural, resíduos 1-31 (SEQ ID NO: 1);

Fig. 2 mostra a estrutura de [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂(SEQ
25 ID NO: 3);

Fig. 3 mostra a estrutura de [Leu²⁷]ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO: 4)

Fig.4 mostra as atividades dos análogos de acordo com o invento na estimulação da adenililciclase das células ROS 17/2;

5 Fig.5 mostra secções histológicas representativas de ossos feitas no final de 8 semanas depois de OOP, ilustrando as diferentes habilidades do hPTH-(1-31)-NH₂ e seus lactans derivados para prevenir o dano ósseo e estimular o crescimento ósseo em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas (ooforectomizadas = OOP);

10 Fig. 6 mostra o volume do osso trabecular de animais de controle e animais tratados com análogos de hPTH por ratos inicialmente severamente com ossos depletados. O tratamento dos animais começou 9 semanas após OOP. [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)hPTH-(1-31)-NH₂ foi o mais eficaz dos fragmentos, restabelecendo os ossos aos valores dos ratos-controle normais; e

Fig. 7 mostra a espessura trabecular do fêmur de ratas normais, ooforectomizadas (OOP), falso, e animais tratados com hPTH-(1-31)-NH₂, [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂, e [Leu²⁷]ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂;

20 Fig. 8 mostra a máxima queda na pressão do sangue e o tempo para a máxima queda na pressão sanguínea na adição duma dose de 0.8 nmol/100g de hPTH-(1-31)-NH₂, [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)hPTH-(1-31)-NH₂, ou [Leu²⁷]ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)hPTH-(1-31)-NH₂. Os peptídios foram administrados tanto via sub-cutânea (coluna em branco) ou via intravenosa

25 (coluna achurada).

Fig. 9 mostra a estrutura [Leu²⁷]-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO: 5).

Fig. 10 mostra a estrutura do ciclo (Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID NO: 6).

Fig. 11 mostra a estrutura de [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂ (SEQ ID NO: 7).

5 Fig. 12 mostra as atividades estimuladoras da adenililciclase de vários análogos de acordo com a invenção.

Fig. 13 mostra a ação hipotensiva do hPTH(1-31)NH₂ e hPTH(1-30)NH₂ e seus análogos cíclicos.

Fig. 14 é um gráfico ilustrando o efeito no desenvolvimento do osso em
10 diferentes dosagens de hPTH(1-31)-NH₂ linear.

Fig. 15 mostra a estrutura da [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-OH (SEQ ID No: 8)

Fig. 16 mostra a estrutura da [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-34)-NH₂ (Seq ID No: 9)

15 Fig. 17 mostra a estrutura da [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-34)-OH (Seq ID No: 10)

Fig. 18 mostra a estrutura da [Ala²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID No: 11)

Fig. 19 mostra a estrutura da [Nle²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂
20 (SEQ ID No: 12)

Fig. 20 mostra a estrutura da [Nle^{8,18}, Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID No: 13)

Fig. 21 mostra a estrutura da ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID No: 14)

25 Fig. 22 mostra a estrutura da [Ile²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID No: 15)

Fig. 23 mostra a estrutura da [Tyr²⁷]ciclo(Glu²² Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (SEQ ID No: 16)

Fig. 24 mostra a estrutura do α -acetil-[Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (Seq ID No: 17)

5 Fig. 25 mostra a estrutura da [Leu²⁷]ciclo(Lys²²-Glu²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (Seq ID No: 18)

Fig. 26 mostra a estrutura da [Leu²⁷]ciclo(Asp²²-Orn²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (Seq ID No: 19)

10 Fig. 27 mostra a estrutura da [Cys²²;Cys²⁶;Leu²⁷]ciclo(Cys²²-Cys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ (Seq ID No: 20)

Fig. 28 mostra a estrutura da [Cys²⁶;Cys³⁰;Leu²⁷]ciclo(Cys²⁶-Cys³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (Seq ID No: 21)

Preparo dos Análogos do Hormônio

A técnica da síntese do peptídeo de fase sólida desenvolvido por R. B. Merrifield ("Solid-Phase Peptide Synthesis", Advances in Enzymology 32, 221-296, 1969), aqui incorporado por referência, é usado largamente e com sucesso para síntese de polipeptídeos tais como o hormônio da paratireóide. A estratégia é baseada tendo-se o aminoácido carboxil-terminal do peptídeo afixado num suporte sólido. Sucessivos aminoácidos são então acrescentados em grande quantidade. O grupo α -amino N-terminal é protegido de tal maneira que este grupo protetor pode ser removido sem a remoção do peptídeo do suporte sólido. A química usada aqui envolve uma modificação do método original de Merrifield, referido como abordagem do Fmoc. O grupo Fmoc (fluorenilmetoxycarbonil) pode ser removido por condições alcalinas brandas, que deixa intactos os grupos protetores representados pelas cadeias laterais alcali-resistentes e a

15

20

25

ligação ao suporte. Esta técnica é descrita por E. Atherton and R. C. Sheppard, " Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach" , IRL Press, New York, N.Y., aqui incorporado para referência .

Exemplo 1

5 Síntese e Purificação dos Análogos Lineares do hPTH-(1-31)-amida

Os grupos α -amino dos aminoácidos são protegidos pelo 9-fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc) durante a ligação. Ligações foram feitas com uma mistura de hidroxibenzotriazol (HOBt), 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1, tetrafluoroborato 1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), e diisopropiletilamina
10 (DIPEA). Um excesso 4X maior de aminoácidos ativados foi usado com dupla ligação na adição dos resíduos Asn, Gln, His, Val, e Ile. Os tempos de ligação para as adições de Arg e Gly foram aumentadas de 30 para 60 min. A ligação do primeiro resíduo (Val³¹) com suporte (Tentagel* R, Rapp Polymere, Tubingen, Germany) foi feita manualmente. Todos os outros
15 passos foram feitos no PerSeptive Biosystems*Model 9050 Plus sintetizador automático de peptídeos. Proteções nas cadeias laterais foram como segue: Arg (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonil); Glu, Asp, e Ser (t-butil); His, Gln, e Asn (tritol); Trp (t-butiloxycarbonil).

Depois da remoção do Fmoc da Ser N-terminal, a resina do
20 peptídeo foi lavada com DCM, então clivada da resina por agitação com 7,5 ml de reagente K (TFA 6,19 ml, 0.38 ml cada de água , fenol/água 90%, e tioanisol, e 0,19 ml de 1,2-etanoditiol) por 4 h a 20° C. A mistura de peptídeo clivada foi removida por filtragem, e precipitada pela adição do t-butil-
25 metiléter. O precipitado foi colhido por centrifugação, lavado 2 x com t-butil-
metiléter, e seco por centrifugação à vácuo.

O produto cru foi dissolvido em 14 ml de acetonitril/água 15%, TFA 0,1% e cromatografado no Vydac* C₁₈-column (10μ, 1 x 25 cm). O produto foi eluído com um gradiente de 1%/min de acetonitrilo (14-40%) em TFA 0,1% em água. A pureza do produto final foi estimada analiticamente por HPLC em um Vydac* C₁₈ column (10μ, 0,4 x 25 cm), e por ensaio de massa molecular num espectrômetro de massa eletrodispersor (VG Quattro). Os dados para hPTH-(1-31)NH₂ assim formado, são fornecidos na tabela 1 abaixo.

Exemplo 2

Síntese e Purificação dos Análogos Cíclicos

[Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂. Este peptídeo foi sintetizado como descrito no Exemplo 1, com Lys-Alloc e Glu-Oall substituídos na posição 26 e 22, respectivamente. Após a adição de Fmoc-Ser¹⁷, o peptídeo-resina foi removido da coluna para um frasco de reação (minivial*, Applied Science), suspenso em 1,7ml de uma solução de paládio(0) tetrakis(trifenilfosfina)(0,24mmol), ác. Acético 5% e N-metilmorfolina(NMMM) 2,5% em diclorometano (DCM) sob argônio, então agitado a 20 ° C por 6 h para remover os grupos protetores alil e alloc (Solé, N.A. et al (1993) In *Peptides: Chemistry, Structure, and Biology*, Smith, J. And Hodges, R. (Eds), ESCOM pp.93-94) aqui reunido como referência. O peptídeo-resina então foi lavado com dietilditiocarbamato (DEDT) 0,5%, NMM 0,5% em DMF(50ml), seguido de DMF (50ml) e DCM (50ml). O peptídeo (0,06 mmol) foi ciclizado por agitação com 0,06mmol de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt)/0,12 mmol de NMM em 2 ml de DMF por 14 h a 20°

(Carpino, L.A. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 4397-4398). O peptídeo-resina foi filtrado, então lavado uma vez com DMF, reacondicionado na coluna, e lavado com DMF até a remoção das bolhas da suspensão. A síntese remanescente foi executada como o Exemplo 1 exceto que o grupo Fmoc N-terminal não foi removido. O peptídeo-Fmoc foi clivado da resina com reagente K como descrito acima. O HPLC foi executado como no exemplo 1, com o grupo Fmoc removido antes do HPLC final.

O análogo [Leu²⁷]ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ foi preparado de maneira semelhante.

Exemplo 3

Ensaio da Adenililciclase

A habilidade dos análogos hPTH de ligar-se aos receptores e ativar o mecanismo de sinalização acoplado à adenililciclase foi determinado numa linha de células ROS 17/2 de osteosarcoma de ratos (ROS) semelhante a osteoblasto com capacidade de diferenciação.

Esta atividade é conhecida por ser fortemente ligada à habilidade do análogo de restabelecer a massa óssea em ratas ooforectomizadas. Atividade Adenililciclase-estimulante foi estimada por pré-marcação do pool celular ATP com [³H]-adenina e então medido a porção de AMP [³H]-cíclico produzido do [³H]-ATP durante os primeiros 10 minutos de exposição a um análogo particular. Foi baseado no procedimento descrito por Whitfield et al, *J. Cellular Physiology* 150, 299-303, 1992, aqui incorporado por referência.

Os resultados da adenililciclase estão expressados na Tabela 2 abaixo como a concentração necessária para expressar o aumento médio-máximo na atividade AC. Os dados também estão expostos na Fig.4. Na Fig.

4, os círculos cheios mostram a atividade adenililciclase-estimulante do hPTH-(1-31)-NH₂ e as atividades [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ e [Leu²⁷]ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ são mostradas por triângulos abertos e fechados, respectivamente.

5

Exemplo 4

Determinação da Atividade Anabólica dos Análogos hPTH com Ratas

Padrão Ooforectomizadas

Dosagens:

Doses foram baseadas nos dados dose-resposta no hPTH-(1-31)-NH₂. A
 10 potência de construção de osso do hPTH-(1-31)-NH₂ foi testada usando-se
 várias doses (0,8, 0,6, 0,4 e 0,2 nmol/100g de peso corporal) e um modelo
 regenerativo ou avaliação de tratamento, em vez de um preventivo ¹¹. Ratas
 com tres meses de idade ooforectomizadas, foram deixadas por 9 semanas
 para permitir que a maior parte do osso trabecular femural não-lamelar fosse
 15 severamente exaurido antes de iniciar as 6 semanas de injeções diárias. No
 final da 9ª semana elas tinham perdido cerca de 75% da sua massa do osso
 trabecular femural. A Figura 14 mostra o aumento dose-dependente na
 espessura trabecular média causada pela deposição lamelar que foi
 produzida pelas 36 injeções de 4 diferentes doses do fragmento. O
 20 fragmento também pode estimular o crescimento trabecular do osso em
 ratas mais velhas. Portanto, 36 injeções da dose de 0,6 nmol/100g do peso
 corporal de hPTH-(1-31)-NH₂ foram capazes de um significativo aumento na
 espessura trabecular média acima do valor normal inicial no osso femural
 trabecular pré-depletado (9 semanas depois de OOP) de ratas de um ano de
 25 idade e foram tão efetivamente quanto o hPTH-(1-84). Por consequência, a

dosagem de 0,6nmol/100g de peso corporal . foi usada em testes posteriores.

Uma descrição completa do protocolo é fornecido no Rixon et al, *J. Bone & Mineral Research* 9,1179-1189, 1994 e Whitfield et al *Calcif. Tissue Int.* 58, 81-87, 1996 aqui incorporado como referência. Ratas Sprague -Dawley (3 meses de idade; 255-260g) Normal, Falso-OOP (ooforectomizada), e OOP (ooforectomizadas) foram compradas do Charles River Laboratories (St. Constant, QC). As ratas foram separadas ao acaso em 8 grupos que receberam ração para ratos Purina e água *ad libitum*. Não houberam mortes inesperadas. Os animais receberam 6 injeções subcutâneas uma vez por dia/ semana começando no fim da segunda semana depois de OOP e terminando ao final da 8ª semana depois de OOP (isto é, 36 injeções). Oito ratas controle falso-OOP e oito OOP receberam 36 injeções de veículo (NaCl 0,15 M contendo HCl 0,001 N) enquanto oito ratas OOP receberam 0,6 nmol do fragmento no veículo/100g de peso corporal). Ao final da 8ª semana depois de OOP, os fêmures foram removidos isolados, limpos e cortados à metade na meia-diáfise e a metade proximal foi descartada. Depois de remover a epífise, cada meio-fêmur foi separado no sentido do comprimento em 2 partes e a medula óssea foi exposta.

A potência ósseo-construtora dos fragmentos foi avaliada pelas mudanças na espessura média (área/perímetro) das trabéculas nos meio-fêmures distais dos vários animais tratados. Para medir a espessura trabecular média , os 2 meio-fêmures desmineralizados de cada rata foram desidratados e embebidos em parafina. Longitudinalmente, secções de 10 µm à partir do meio de cada osso foram cortadas e então coradas com o corante rápido para osso Sanderson (Surgipath Medical Industries, Inc.

Winnipeg, MB, Canadá). A espessura trabecular média foi medida usando-se um sistema de imagem M4 e um software morfométrico ósseo da Imaging Research Inc., (St Catherines, ON, Canadá).

Secções histológicas representativas dos osso preparados no final de 8 semanas depois de OOP são mostrados na Figura 5. Os resultados são posteriormente apresentados em forma de gráfico de barras na Fig 7. As barras mostram os valores da espessura trabecular da normal, ooforectomizada (OOP), falso, hPTH-(1-31)-NH₂, [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂, e [Leu²⁷]ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂. O [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ mostra especialmente uma atividade superior comparada ao análogo linear, hPTH-(1-31)-NH₂. Este análogo linear tem se mostrado como sendo completamente ativo na restauração óssea, mas usa somente um trajeto de sinalização celular (o AC-ativado). Deste modo, espera-se que estes análogos cíclicos, como seus análogos lineares, tenham menores efeitos colaterais clínicos indesejáveis do que seus complementos mais longos, tais como hPTH-(1-34) ou hPTH-(1-84), que ativam ambos mecanismos de sinalização celular.

Exemplo 5

Restauração do Osso pelos Análogos hPTH de Ratas com Osso Trabecular

Severamente Depletado

Neste segundo exemplo de restauração óssea, são comparadas as habilidades dos fragmentos lactam, em restaurar o osso trabecular severamente depletado. Neste experimento, o programa de 6 semanas de injeções diárias de 0,6 nmol de peptídeo /100g de peso do corpo em ratas jovens sexualmente maduras foi retardado até o final da 9ª semana depois de OOP. A esta altura, 75% de seu osso trabecular tinha

sido perdida. Como pode ser visto na Figura 6, [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ foi o mais efetivo dos fragmentos. Restaurou o volume do osso trabecular para os valores em ratas controles normais.

Exemplo 6

5 Efeitos Hipotensivos dos Análogos hPTH

Ratas Sprague-Dawley (pesando mais de 290g) foram anestesiadas com pentobarbital sódico injetado intraperitoneal (65 mg/Kg de peso corporal. A temperatura retal foi monitorada com um termistor YSI402 (Yellow Springs Instrument Co., Inc. Yellow Springs, OH) e mantida entre 36
10 e 38,5° C durante a experiência. A temperatura do pavilhão da orelha foi monitorada usando-se um termistor de banjo YSI. A artéria da cauda foi exposta e canulada com um catéter Jelco 25-gIV (Johnson and Johnson Medical Inc., Arlington, TX) e conectado a um *Statham pressure transducer*, cujos sinais vitais foram gravados digitalmente com um Biopac Systems
15 MP100 Monitor (Harvard Instruments, Saint Laurent, QC, Canadá). Para injeção intravenosa do hPTH ou um de seus fragmentos, uma veia femural foi exposta também. Depois da cirurgia, a rata foi deixada estabilizar por 8 min depois do qual o PTH ou um de seus fragmentos (dissolvido em salina acidificada contendo HCl 0,001 N) foi injetado na veia femural ou sob a pele
20 do abdômen. Foram coletados dados por 12 min depois da injeção intravenosa ou por 22 min depois da injeção subcutânea. A Figura 8 mostra a queda máxima na pressão do sangue e tempo para queda máxima em adição de dose de 0,8 nmol/100g de [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ ou [Leu²⁷]ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ para administração por
25 rota subcutânea(barra aberta) ou intravenosa (barra achurada). O análogo [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂ mostra uma biodisponibilidade

aumentada, se comparado ao [Leu²⁷]ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂.

Isto é indicado pelo tempo muito menor preciso para cair para a mínima pressão do sangue depois da injeção subcutânea. Ambos os análogos cíclicos mostram efeitos hipotensivos acentuados quando injetados por via subcutânea, quando comparados ao hPTH-(1-31)-NH₂. Assim, espera-se que cada análogo cíclico lactan, quando injetado via subcutânea, tenha mais propriedades desejáveis que sua réplica linear. Estas incluem maior biodisponibilidade, resultando em resistência acentuada à proteases e/ou habilidade aumentada para ser transportado de meios lipídicos. A última pode ser devido à estabilização da hélice anfifílica perto do C-terminal do hormônio.

Resultados posteriores:

Para o propósito destes resultados, os peptídeos são identificados como segue:

hPTH-(1-31)-NH₂(1); [Leu²⁷]-hPTH-(1-31)-NH₂(2)(Fig.9);[Leu²⁷] ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂(3)(Fig.2); [Leu²⁷]ciclo(Lys²⁶-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂(4); ciclo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (5)(Fig.10); hPTH-(1-30)-NH₂(6); [Leu²⁷]-hPTH-(1-30)-NH₂(7); [Leu²⁷]ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂(8).

Atividades da Adenililciclase. Nós reportamos previamente que [Leu²⁷]-hPTH-(1-34)-NH₂ é mais ativa na estimulação da atividade AC na linha de células ROS do que hPTH-(1-34)-NH₂.⁵ Ahamos também que o peptídeo 2 (EC₅₀, 11,5 ± 5,2 nM) é mais ativo que a sequência nativa 1, (EC₅₀, 19,9 ± 3,9 nM) (Fig 12). Os mostrados são peptídeos 1 (●);2 (□);3 (Δ); 4(▲); 5(O). A formação de lactan entre Glu²² e Lys²⁶ (3) induziu a uma maior ainda atividade AC-estimulante, com valores EC₅₀ de 3,3 ± 0,3 nM (Fig.12). Assim o efeito líquido desta ciclização e a substituição de Lys por Leu é

cerca de 6x de aumento na atividade. Em contraste, a formação de lactan tanto entre Lys²⁶ e Asp³⁰ (**4**) ou Lys²⁷ e Asp³⁰(**5**) resultou numa diminuição da estimulação da adenililciclase, com respeito às suas seqüências lineares de origem. Assim, o lactan 26-30 (**4**) tem ligeiramente menos atividade que sua forma linear, com um EC₅₀ de 17,0 ± 3,3 nM vs 11,5 ± 5,2 nM para **2**. O lactan 27-30 (**5**) reduz mais marcadamente a atividade do peptídio linear de origem, tendo um EC₅₀ de 40,3 ± 4,4 nM se comparado com 19 ± 3,9 nM para **1**.

Nos reportamos previamente que hPTH-(1-30)-NH₂ (**6**) tem uma atividade AC-estimulante (EC₅₀, 20 nM), próxima à aquela do análogo **1**. Achamos agora que [Leu²⁷]-hPTH-(1-30)-NH₂(**7**) e ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)-NH₂ (**8**). (Fig 11) tem atividades AC-estimulantes similares ao peptídio **6**.

Efeitos Hipotensivos:

A Figura 13 mostra a ação hipotensiva dos análogos lineares (**6** e **7**) e lactan cíclicos (**3** e **8**). São mostradas as quedas máximas na pressão do sangue (acima) obtidas injetando na rata 0,8 nmol/100g de peso corporal do análogo e tomado o tempo para atingir a queda máxima da pressão do sangue (abaixo). Os análogos (da esquerda para a direita, peptídeos **8,7,6,3**) foram injetados tanto via intravenosa (barra sombreada) ou subcutânea (barra aberta). A remoção de Val³¹ resultou em todos os análogos **6,7,8** tendo índices significativamente ($p < 0,05$) reduzidos de transporte de peptídeos injetados via subcutânea para o sistema vascular (Fig.13). As quedas reais totais na pressão do sangue dos peptídios **6** e **8** não foram, não obstante, significativamente diferentes ($p > 0,05$) daquelas dos outros

análogos, se administrados via subcutânea ou intravenosa, com exceção do peptídeo 5.

ENSAIO CORRELACIONANDO O EFEITO HIPOTENSIVO COM ATIVIDADE OSTEOGÊNICA

5 Como é descrito no Exemplo 6 e ilustrado na Figura 8, um rápido efeito hipotensivo observado a seguir duma injeção subcutânea de análogos hPTH se correlaciona com a atividade osteogênica. Consequentemente o teste é útil para *screening* de análogos hPTH candidatos pelo efeito osteogênico e eliminar hipóteses inapropriadas, sem
10 ter que sacrificar os animais de laboratório.

 Para fins de experiência, temos usado um único conjunto de fragmentos PTH osteogênico e não osteogênico AC-, AC/PLC-, ou PLC-ativador para provar definitivamente que é somente a estimulação AC que reduz a pressão do sangue e comparar as ações hipotensivas destes
15 fragmentos quando são injetados subcutânea ou intravenosamente em ratas. Temos mostrado que a resposta hipotensiva é ativada somente por fragmentos AC- ou AC/PLC-estimulador e que é a relativamente pequena resposta hipotensiva para a injeção subcutânea, e não a resposta muito mais ampla à injeção intravenosa, que se correlaciona com as atividades
20 osteogênicas do hPTH-(1-31)-NH₂, hPTH-(1-34), e hPTH-(1-84) em ratas OOP, mas não por hPTH-(1-30)-NH₂, que estimula AC e reduz a pressão arterial, mas não estimula a formação do osso.

 Especificamente, hPTH-(1-84) e seus fragmentos hPTH-(1-34), hPTH-(1-31), e hPTH-(1-30)-NH₂ reduziram a pressão da artéria da cauda de
25 ratas Sprague-Dawley anestesiadas por 42,4-67,1% dentro de cerca de 1 minuto depois da injeção na veia femural, mas reduziram a pressão somente

por 8,5-36,2% de 2-19 minutos depois da injeção subcutânea. Ambos, hPTH-(1-84) e hPTH-(1-34), estimulam adenililciclase (AC) e fosfolipase-C (PLC) nas suas células alvo, mas a ação hipotensiva deve ter sido estimulada especificamente pela ativação adenililciclase, porque hPTH-(1-30)-NH₂ e hPTH-(1-31)-NH₂, que podem somente estimular a adenililciclase, eram potencialmente hipotensivos quando injetados intravenosamente enquanto que hPTH-(7-84), que pode estimular a fosfolipase-C, não era significativamente hipotensivo quando injetado intravenosamente. Desde que a ação osteogênica do PTH é também mediada pela estimulação da adenililciclase, era esperado que a resposta hipotensiva poderia ser usada para procurar novas estruturas de PTH com possível osteogenicidade. Na verdade, as atividades osteogênicas de hPTH-(1-31)-NH₂, hPTH-(1-34), e hPTH-(1-84) injetados via subcutânea correlacionam-se intimamente com suas atividades hipotensivas, com o hPTH-(1-34) sendo muito mais hipotensivo e significativamente mais do que as outras duas moléculas. hPTH-(1-31)-NH₂ e hPTH-(1-84) foram igualmente osteogênicos e hipotensivos. No entanto, esta correlação acabou com hPTH-(1-30)-NH₂ que estimula AC quase que tão fortemente quanto hPTH-(1-31)-NH₂ e hPTH-(1-34) e reduz a pressão do sangue tanto quanto hPTH-(1-31)-NH₂ mas não estimula a formação do osso. Todavia, a habilidade em reduzir significativamente a pressão arterial é uma propriedade comum do PTH e fragmentos do PTH osteogênicos e é deste modo uma indicação rapidamente determinante e preliminar da bioatividade in vivo dos fragmentos do PTH.

Mais especificamente, ambos hPTH-(1-34) e hPTH-(1-31)-NH₂ foram maximamente hipotensivos à 0,8nmol/100g de peso corporal.

Esta resposta hipotensiva foi acompanhada por um ruborescimento transitório (20-30 min) das patas e orelhas das ratas, que pode ser considerado como um útil marcador visual qualitativo.

Ainda que fragmentos AC- ou AC/PLC-estimulantes sejam
5 potencialmente hipotensivos quando injetados via intravenosa, uma injeção intravenosa de 0,8 nmol/100g de peso corporal de hPTH-(7-84), que só pode estimular PLC, muito lentamente ($9,8 \pm 2,0$ min) e só muito levemente, reduziu a pressão da artéria da cauda de $3,28 \pm 1,0$ mmHg comparada com a pronta(0,9 0,08min) redução de $43,2 \pm 5,8$ mmHg causada pela AC/PLC-
10 estimulação do hPTH-(1-84) ou a igualmente pronta queda de $51,6 \pm 3,3$ mmHg causada pela AC-estimulação do hPTH-(1-31)-NH₂.

Uma injeção subcutânea de um fragmento AC- ou AC/PLC-estimulante causou uma redução mais lenta e menor da pressão da artéria da cauda do que uma injeção intravenosa da mesma dose. Por exemplo,
15 0,8nmol/100g de peso do corpo de hPTH-(1-34) reduziu a pressão por somente $27,9 \pm 3,6$ mmHg quando injetado subcutânea se comparada com $50,9 \pm 5,6$ mmHg quando injetada intravenosa. A mesma dose de hPTH-(1-31)-NH₂ reduziu a pressão por somente $11,1 \pm 1,6$ mmHg quando injetado subcutânea se comparada com $51,6 \pm 3,3$ mmHg quando injetado
20 intravenoso.

Não houve diferença significativa entre as reduções rápida e grandes na pressão da artéria da cauda causada pela injeção intravenosa de hPTH-(1-84), hPTH-(1-34), e hPTH-(1-31)-NH₂, mas hPTH-(1-34), foi pelo menos duplamente tão efetivo ($p < 0,01$) do que as outras duas moléculas
25 quando injetadas subcutânea.

Um dos fatores que afetam a ação hipotensiva e a osteogenicidade do PTH ou do fragmento de PTH injetado subcutânea é sua habilidade de se mover sem ser inativado do local da injeção para seus alvos, primeiro na vascularização e depois nos ossos. Esta habilidade é refletida no tempo necessário para que a pressão da artéria da cauda caia ao seu valor mínimo após a injeção. Encurtando a molécula de PTH C-terminal de 84 para 31 resíduos eliminaram a habilidade de estimular PLC sem diminuir a habilidade de estimular AC e decresceu por 9 vezes a quantidade de tempo necessário para a pressão da artéria da cauda alcançar seu mínimo. Retirando mais um resíduo para fazer hPTH-(1-30)-NH₂ aumentou dramaticamente a quantidade de tempo necessário para a pressão do sangue cair ao seu mínimo de $2,0 \pm 0,31$ minutos no caso do hPTH-(1-31)-NH₂ para $13,8 \pm 2,3$ minutos. No entanto, é importante notar que hPTH-(1-31)-NH₂ não levou mais tempo para reduzir a pressão do sangue que o hPTH-(1-84).

O uso no presente estudo do hPTH-(1-31)-NH₂, a primeira estrutura PTH a ser capaz de estimular AC tão fortemente como hPTH-(1-34) sem ativação PLC e estimulando a atividade de PKC membrana-associada, agora tem provido a prova mais direta que a ação hipotensiva do PTH é inteiramente devido à ativação AC. Deste modo, apesar da injeção intravenosa de 0,8 nmol/100g de peso do corpo de hPTH-(7-84), que só pode estimular PLC/PKCs, não afetou significativamente a pressão da artéria da cauda, a injeção intravenosa da mesma dose de hPTH-(1-31)-NH₂ baixou a pressão tanto quanto hPTH-(1-34).

Desde que AC também media a estimulação PTH-induzida da formação cortical e trabecular do osso em ratas OOP, o estímulo para a

resposta hipotensiva em ratas íntegras parece ser um simples indicador rapidamente mensurável de uma possível osteogenicidade da estrutura PTH. Por outro lado, a falha em reduzir a pressão arterial eliminaria um fragmento de uma posterior avaliação, deste modo evitando testes de

5 osteogenicidade desnecessários, caros e demorados em ratas OOP. As respostas hipotensivas para injeções intravenosas dos PTHs não estavam correlacionadas com osteogenicidades. Porém, as respostas hipotensivas muito menores à injeção subcutânea de hPTH-(1-31)NH₂, hPTH-(1-34), e hPTH-(1-84) foram paralelas a osteogenicidade destas moléculas, com

10 hPTH-(1-34) tendo as ações hipotensiva e osteogênica mais forte e as outras duas moléculas sendo tão efetivas quanto cada uma, mas menos efetivas do que hPTH-(1-34), em reduzir a pressão do sangue e estimulação da formação óssea. Mas esta correlação acabou com o hPTH-(1-30)NH₂ que estimula AC quase tão fortemente quanto hPTH-(1-31)NH₂ e hPTH-(1-34) e

15 reduziu a pressão do sangue tanto quanto hPTH-(1-31)NH₂ mas não estimula a formação do osso.¹¹ A razão para esta falta de osteogenicidade é desconhecida. Não pode ser devido somente ao hPTH-(1-30)NH₂ injetado subcutâneo precisar de mais tempo para reduzir a pressão do sangue, porque hPTH-(1-84) injetado subcutâneo precisa da mesma quantidade de

20 tempo para reduzir a pressão do sangue, e ainda é fortemente osteogênico. Claramente a resposta osteogênica depende de muitos fatores que se combinam para possibilitar a chegada, do local da injeção, de suficiente hormônio ativo ou fragmento de hormônio aos osteoblastos maduros receptor-expresso alvo do PTH. A falha da AC-estimulação, hPTH-(1-30)NH₂

25 redutor de pressão sanguínea para estimular a formação do osso deve ser o resultado da combinação de grande instabilidade, um leve aumento de EC₅₀

para estimulação AC, isto é, 20nM em vez de 16nM pelo hPTH-(1-31)NH₂ e hPTH-(1-34) e um longo período para entrar na circulação através do local da injeção.

Apesar da falha do hPTH-(1-30)NH₂ em ser osteogênico, a
5 habilidade de reduzir significativamente a pressão arterial ainda é uma propriedade comum dos PTHs osteogênicos e é portanto um indicador determinante rápido da possível bioatividade dos fragmentos PTH in vivo. Acontece que a resposta hipotensiva deve servir também como um indicador efetivo da habilidade de uma estrutura de PTH osteogênico em chegar aos
10 alvos após administração via oral ou outras rotas não injetáveis.

O desconforto e outras possíveis sequelas de uma reação hipotensiva a cada injeção deve limitar a disposição de pacientes com osteoporose em aceitar tratamento longo com PTH ou fragmento de PTH. Felizmente injeções subcutâneas intermitentes são atualmente usadas para
15 estimular a formação do osso e estas moléculas são todas de longe menos hipotensivas quando injetadas subcutânea do que quando injetadas intravenosa. Como discutimos previamente^{6,7}. O hPTH-(1-31)NH₂ teria a vantagem adicional de estimular AC sem estimular PLC e quaisquer efeitos colaterais potenciais Ca²⁺- e PKCs-intermediados que ele pudesse
20 desencadear.

Exemplo 7

Ciclo(Lys²⁷-Asp³⁰)-hPTH-(1-31)-NH₂ (5). A síntese foi feita de uma maneira análoga ao daquela da [Leu²⁷]-ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-31)-NH₂. O produto tinha uma pureza de >95%, com uma massa molecular de
25 3700,64 (±0,38) (massa esperada (M+1)=3700,14). O peptídeo foi sequenciado para confirmar a posição do lactan.

29/52
[Leu²⁷]-ciclo(Glu²²-Lys²⁶)-hPTH-(1-30)- NH₂.(8). Este peptídeo

foi sintetizado como o peptídeo 3, sem a adição manual de Val ao suporte. O produto teve uma pureza estimada de >97%, com uma massa molecular de 3586,14(±0,19) (massa esperada (M+1)=3685,99).

5 Os análogos da presente invenção podem ser administrados à animais de sangue quente, em necessidade, particularmente humanos, por via parenteral, tópico ou retal, ou por inalação ou via oral. Os análogos podem ser convencionalmente formulados sob forma de dosagem parenteral composta em torno de 1 a cerca de 300 mg por unidade de
10 dosagem com um veículo convencional, excipiente, aglutinante, conservante, estabilizante, cor, agente ou como é chamado por um sistema farmaceuticamente aceito. Para administração parenteral uma injeção subcutânea indolor de 1 ou 2 ml com uma agulha ultra-fina de calibre 30 G poderia ser administrada por não mais de uma vez por dia, por 1 ou 2 anos,
15 dependendo da severidade da doença. O material injetado deveria conter uma das invenções presentes numa solução aquosa, isotônica e estéril ou em suspensão (opcionalmente com um conservante como fenol ou um agente solubilizante como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)). Entre os veículos e solventes aceitos que podem ser empregados são água, água
20 levemente acidificada, solução de Ringer e solução isotônica de cloreto de sódio. Em adição, óleos fixos estéreis são convencionalmente empregados como solvente ou meio de suspensão. Monoglicerídios, diglicerídios, ácidos graxos (como ácido oleico) sintéticos são usados como óleos fixos na preparação dos injetáveis.

25 Para administração retal, os análogos da presente invenção podem ser preparados sob forma de supositórios misturando-os com um

excipiente apropriado não irritante como manteiga de cacau ou polietilenoglicóis.

Para uso tópico os análogos da presente invenção podem ser preparados sob forma de unguentos, geléias, soluções, suspensões ou curativos aderentes à pele.

Para inalação, pode ser conseguido, por exemplo, pelo método descrito no depósito público PCT nº W094/07514.

A dose diária não deve exceder a 0,05mg/Kg de peso corporal, ou cerca de 3,5mg/70Kg humanos, dependendo da atividade do componente específico, da idade, peso, sexo e das condições do paciente sendo tratado. Como deve ser bem esclarecido, a quantidade do ingrediente ativo que deve ser misturado aos materiais de transporte para produzir uma única dose irá variar dependendo da população a ser tratada e o modo particular de administração.

Na lista tabulada que segue os análogos foram todos produzidos de acordo com os procedimentos descritos acima.

Tabela 1 Massas Moléculares dos Análogos do PTH

SEQ ID	Análogo	Massa (determinada)	Massa (esperada) (M + 1)
1	hPTH-(1-31)-NH ₂	3717.77 (±0.13)	3717.14
3	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3685.46 (±0.46)	3685.12
7	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-30)-NH ₂	3586.14 (±0.19)	3585.99
4	[Leu ²⁷]cyclo(Lys ²⁶ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3685.61 (±0.36)	3685.12
6	cyclo(Lys ²⁷ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3700.64 (±0.38)	3700.14
8	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-OH	3685.96 (±0.07)	3686.12
9	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-NH ₂	4083.62 (±0.33)	4083.52
10	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-OH	4084.14 (±0.87)	4084.52
11	[Ala ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3642.70 (±0.76)	3643.04
12	[Nle ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684.57 (±0.99)	3685.12
13	[Nle ^{8,18} ,Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁵)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3649.50 (0.59)	3649.04
14	cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3699.66 (±0.49)	3700.14
15	[Ile ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684.76 (±0.74)	3685.12

Tabela 1 Massas Moleculares dos Análogos do PTH

SEQ ID	Análogo	Massa Determinada	Massa (esperada) (M+1)
16	[Tyr ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3734.47 (±0.80)	3735.14
17	α-acetyl-[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3726.25 (±0.42)	3727.12
18	[Leu ²⁷]cyclo(Lys ²² -Glu ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3684.67 (±0.52)	3685.12
19	[Leu ²⁷]cyclo(Asp ²² -Ome ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3656.90 (±0.67)	3657.12
20	[Cys ²² ;Cys ²⁶ ;Leu ²⁷]cyclo(Cys ²² -Cys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3651.26 ±0.31	3650.1
21	[Cys ²⁶ ;Cys ³⁰ ;Leu ²⁷]cyclo(Cys ²⁶ -Cys ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3663.61 ±0.16	3664.13

Tabela 2 Atividades Adenililciclase (AC) dos Peptídeos Análogos

SEQ ID	Análogo	Adenililciclase (EC ₅₀)
1	hPTH-(1-31)-NH ₂	20
3	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3
7	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-30)-NH ₂	20
4	[Leu ²⁷]cyclo(Lys ²⁶ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	3*, 17**
6	cyclo(Lys ²⁷ -Asp ³⁰)-hPTH-(1-31)-NH ₂	40
8	Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-OH	7
9	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-NH ₂	8
10	[Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-34)-OH	6
11	[Ala ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
12	[Nle ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
13	[Nle ^{8,18} ;Leu ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	6
14	cyclo(Glu ²² -Lys ²⁵)-hPTH-(1-31)-NH ₂	17
15	[Ile ²⁷]cyclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9

Tabela 2 Atividades Adenililciclase (AC) dos Peptídeos Análogos

SEQ ID	Análogo	Adenililciclase (EC ₅₀)
16	[Tyr ²⁷]ciclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	9
17	α-acetyl-[Leu ²⁷]ciclo(Glu ²² -Lys ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	24
18	[Leu ²⁷]ciclo(Lys ²² -Glu ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	4
19	[Leu ²⁷]ciclo(Asp ²² -Ome ²⁶)-hPTH-(1-31)-NH ₂	>200
20	[Cys ²² ;Cys ²⁶ ;Leu ²⁷]ciclo(Cys ²² -Cys ²⁶)hPTH(1-31)NH ₂	16
21	[Cys ²⁶ ;Cys ³⁰ ;Leu ²⁷]ciclo(Cys ²⁶ -Cys ³⁰)hPTH(1-31)NH ₂	24

* Fig. 4
 ** Fig. 12

REFERÊNCIAS

As exposições das seguintes referências são aqui incorporadas por referência.

5

- (1) Caulfield, M. P.; McKee, R. L.; Goldman, M. E.; Duong, L. T.; Fisher, J. E.; Gay, C. T.; DeHaven, P. A.; Levy, J. J.; Roubini, E.; Nutt, R. F.; Chorev, M.; Rosenblatt, M. The Bovine Renal Parathyroid Hormone(PTH) Receptor Has Equal Affinity for 2 Different Amino Acid Sequences - The Receptor Binding Domains of PTH and PTH-Related Protein Are Located Within the 14-34 Region. *Endocrinology* 1990, 127, 83-87.

10

- (2) Neugebauer, W.; Barbier, J.-R.; Sung, W.L.; Whitfield, J.F.; Willick, G.E. Solution Structure and Adenylyl Cyclase Stimulating Activities of C-Terminal Truncated Human Parathyroid Hormone Analogues *Biochemistry* 1995, 34, 8835-8842.

15

- (3) Gardella, T. J.; Wilson, A. K.; Keutmann, H. T.; Oberstein, R.; Potts, J. T.; Kronenberg, H.M., and Nussbaum, S. R. Analysis of Parathyroid Hormone's Principal Receptor-Binding Region by Site-Directed Mutagenesis and Analog Design. *Endocrinology* 1993, 132, 2024-2030.

20

- (4) Marqusee, S.; Baldwin, R.L. Helix Stabilization by Glu ...Lys+ Salt Bridges in Short Peptides of De Novo Design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987, 84,8898-8902.

25

- (5) Surewicz, W.K.; Neugebauer, W.; Gagnon, L.; MacLean, S.; Whitfield, J.F.; Willick, G.E. Structure-Function Relationships in Human Parathyroid Hormone: The Essential Role of Amphiphilic-Helix. In *Peptides: Chemistry, Structure, and Biology* 1993; Smith, J.; Hodges, R., Eds.; ESCOM Leiden, The Netherlands, 1993, pp. 556-558
- (6) Whitfield, J. F.; Morley, P.; Willick, G. E.; Ross, V.; Barbier, J. R.; Isaacs, R. J.; Ohannessianbarry, L. Stimulation of the Growth of Femoral Trabecular Bone in Ovariectomized Rats by the Novel Parathyroid Hormone Fragment, hPTH-(1-31)NH₂ (Ostabolin) *Calcif. Tissue Int.* **1996**, *58*, 81-87.
- (7) Whitfield, J. F.; Morley, P. Small Bone-Building Fragments of Parathyroid Hormone: New Therapeutic Agents for Osteoporosis *Trends Pharmacol. Sci.* **1995** *16*, 382-386.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÕES GERAIS

(i) REQUERENTE:

- 5 (A) Nome: National Research Council of Canada
- (B) RUA: Intellectual Property Services
Montreal Road, M-58, Room EG-12
- (C) CIDADE: Ottawa
- (D) ESTADO: Ontario
- (E) PAÍS: Canadá
- 10 (F) ZIP: K1A 0R6

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: ANÁLOGOS DO HORMÔNIO DA
PARATIREÓIDE PARA O TRATAMENTO DE OSTEOPOROSE

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 33

(iv) FORMA DE LEITURA DO COMPUTADOR:

- 15 (A) TIPO MÉDIO: Floppy disk
- (B) COMPUTADOR: IBM PC compatível
- (C) SISTEMA DE OPERAÇÃO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version # 1.30

(v) DADOS ATUAIS DO DEPÓSITO:

- 20 (A) NÚMERO DO DEPÓSITO: PCT/CA97/OO547
- (B) DATA DO REGISTRO: 01-AGO-1997

(vi) DADOS PRÉVIOS DO DEPÓSITO:

- (A) NÚMERO DO DEPÓSITO: 08/691.647
- (B) DATA DO REGISTRO: 02-AGO-1996

25 (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

5 (ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

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

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val

10 20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

15 (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 2:

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

20 1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val

20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

25 (A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

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

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val

20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 4

10 (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

15 (ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4

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

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val

20 20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

25 (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

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

1 5 10 15

5 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val

20 25 30

2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

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

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val

20 25 30

2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 7

20 (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 30 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

25 (ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

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

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp

20 25 30

5 2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 8

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

10 (D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

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

1 5 10 15

15 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val

20 25 30

2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 9

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 34 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 9:

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

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His

20

25

30

Asn Phe

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 10

5 (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 34 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

10 (ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 10:

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

1

5

10

15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His

15

20

25

30

Asn Phe

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 11

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

20 (B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 11:

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

1

5

10

15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Ala Leu Gln Asp Val

20

25

30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 12

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

5

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

10

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 12:

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

1

5

10

15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Xaa Leu Gln Asp Val

20

25

30

15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 13

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

20

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 13:

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

1

5

10

15

25

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val

20

25

30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 14

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

5 (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 14:

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

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

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 15

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

15 (A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 15:

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

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

25 (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 16

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA.
- (D) TOPOLOGIA: circular

5 (ii)TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi)DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 16

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

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Tyr Leu Gln Asp Val

10 20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 17

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: circular

15

(ii)TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi)DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 17:

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

20 1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val

20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 18

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

25

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 18:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 19

10 (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

15 (ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 19:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 20

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

25 (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 20:

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

1 5 10 15

5 Ser Met Glu Arg Val Cys Trp Leu Arg Cys Leu Leu Gln Asp Val

20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 21

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

10 (B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 21:

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

1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Cys Leu Leu Gln Cys Val

20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 22

20 (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 34 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

25 (ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 22:

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

1 5 10 15.

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His

20 25 30

5 Asn Phe

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 23

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10 (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 23:

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

15 1 5 10 15

Xaa Xaa Glu Arg Val Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa

20 25 30

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 24

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

20 (A) EXTENSÃO: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

25 (xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 24:

Val His Asn Xaa

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 25

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 5 aminoácidos

5 (B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 25:

10 Val His Asn Phe Xaa

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 26

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 6 aminoácidos

15 (B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 26:

20 Val His Asn Phe Val Xaa

1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 27

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 7 aminoácidos

25 (B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 27:

Val His Asn Phe Val Ala Xaa

5 1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 28

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10 (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 28:

Val His Asn Phe Val Ala Leu Xaa

15 1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 29

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20 (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 29:

His Lys Lys Lys

25 1

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 30

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) EXTENSÃO: 4 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

5

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 30:

His Leu Lys Lys

1

10 (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 31

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) EXTENSÃO: 4 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

15

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 31:

Lys Lys Lys Lys

1

20 (2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 32

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) EXTENSÃO: 4 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:
- (D) TOPOLOGIA: linear

25

(ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 32:

His Leu Lys Ser

1

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 33

5 (i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) EXTENSÃO :5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CARACTERÍSTICA DA CADEIA:

(D) TOPOLOGIA: linear

10 (ii) TIPO DA MOLÉCULA: peptídio

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 33:

Val Leu Asn Phe Xaa

1

5

REIVINDICAÇÕES

1. “ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH E SAIS FARMACEUTICAMENTE ACEITAVEIS DESTE”, caracterizado por ser selecionado do grupo consistindo do ciclo (Glu₂₂-Lis₂₆)[Leu₂₇]hPTH(1-31)-NH₂, ciclo(Glu₂₂-Lis₂₆)[Leu₂₇]hPTH(1-31)-OH, ciclo(Glu₂₂-Lis₂₆)[Leu₂₇]hPTH(1-34)-NH₂, ciclo(Glu₂₂-Lis₂₆)[Leu₂₇]hPTH(1-34)-OH, ciclo(Glu₂₂-Lis₂₆)[Ala₂₇]hPTH(1-31)-NH₂, ciclo(Glu₂₂-Lis₂₆)[Nle₂₇]hPTH(1-31)-NH₂, ciclo(Glu₂₂-Lis₂₆)[Nle_{8,18},Leu₂₇]hPTH(1-31)-NH₂, ciclo(Glu₂₂-Lis₂₆)[Ile₂₇]hPTH(1-31)-NH₂, ciclo(Glu₂₂-Lis₂₆)[Tir₂₇]hPTH(1-31)-NH₂ e ciclo(Lis₂₂-Glu₂₆)[Leu₂₇]hPTH(1-31)-NH₂.

2. “ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a SEQ ID NO: 3.

3. “ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a SEQ ID NO: 8.

4. “ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a SEQ ID NO: 9.

5. ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a SEQ ID NO: 10.

6. ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a SEQ ID NO: 11.

7. ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a SEQ ID NO: 12.

8. ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a SEQ ID NO: 13.

9. ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ter a SEQ ID NO: 15.

10. **ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH**", de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ter a SEQ ID NO: 16.

11. **ANÁLOGO DE HORMÔNIO HUMANO DA PARATIREÓIDE hPTH**", de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ter a SEQ ID NO: 18.

5 12. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, **caracterizado por** compreender um análogo de hormônio humano da paratireóide hPTH de acordo com a reivindicação 1, em associação com um transportador ou excipiente farmacologicamente aceitável.

10 13. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** análogo ter a SEQ ID NO: 3.

14. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** análogo ter a SEQ ID NO: 8.

15 15. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** análogo ter a SEQ ID NO: 9.

20 16. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** análogo ter a SEQ ID NO: 10.

17. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** análogo ter a SEQ ID NO: 11.

25 18. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12,

caracterizado pelo análogo ter a SEQ ID NO: 12.

19. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** análogo ter a SEQ ID NO: 13.

5 20. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** análogo ter a SEQ ID NO: 15.

21. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12,
10 **caracterizado pelo** análogo ter a SEQ ID NO: 16.

22. **COMPOSIÇÃO PARA ADMINISTRAÇÃO PARA ANIMAIS DE SANGUE QUENTE QUE NECESSITAM DESTA**, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado pelo** análogo ter a SEQ ID NO: 18.

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-
Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-COOH

Fig. 1

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

Fig. 2

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

Fig. 3

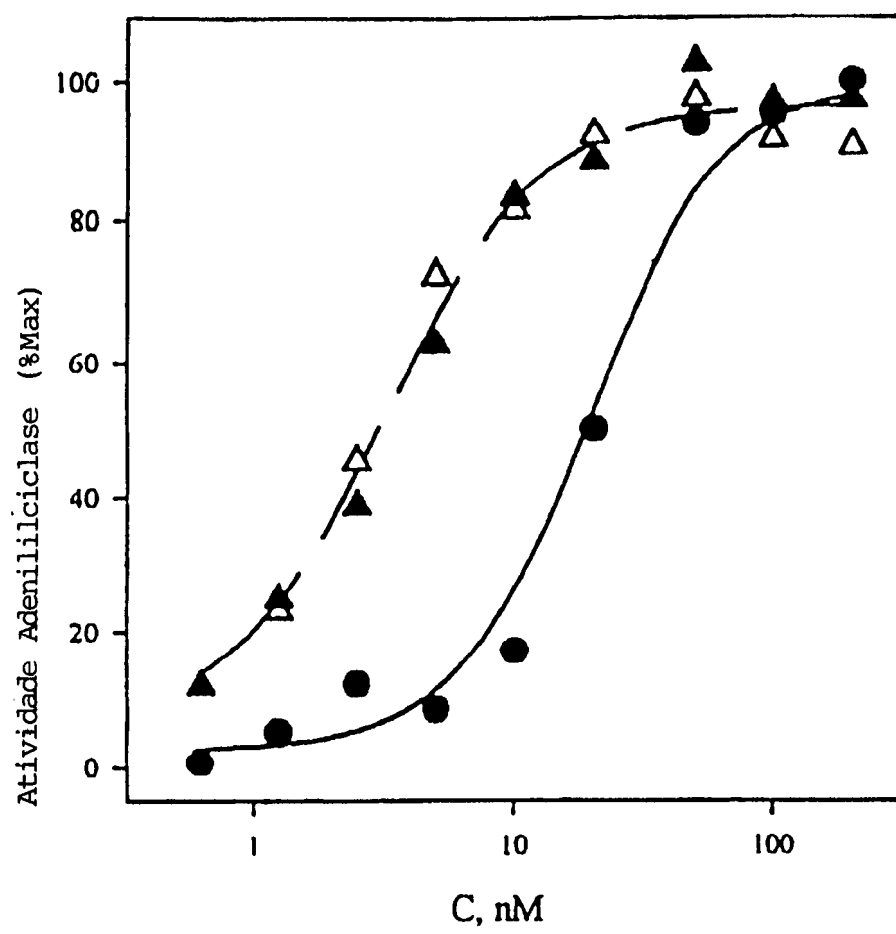


Fig. 4

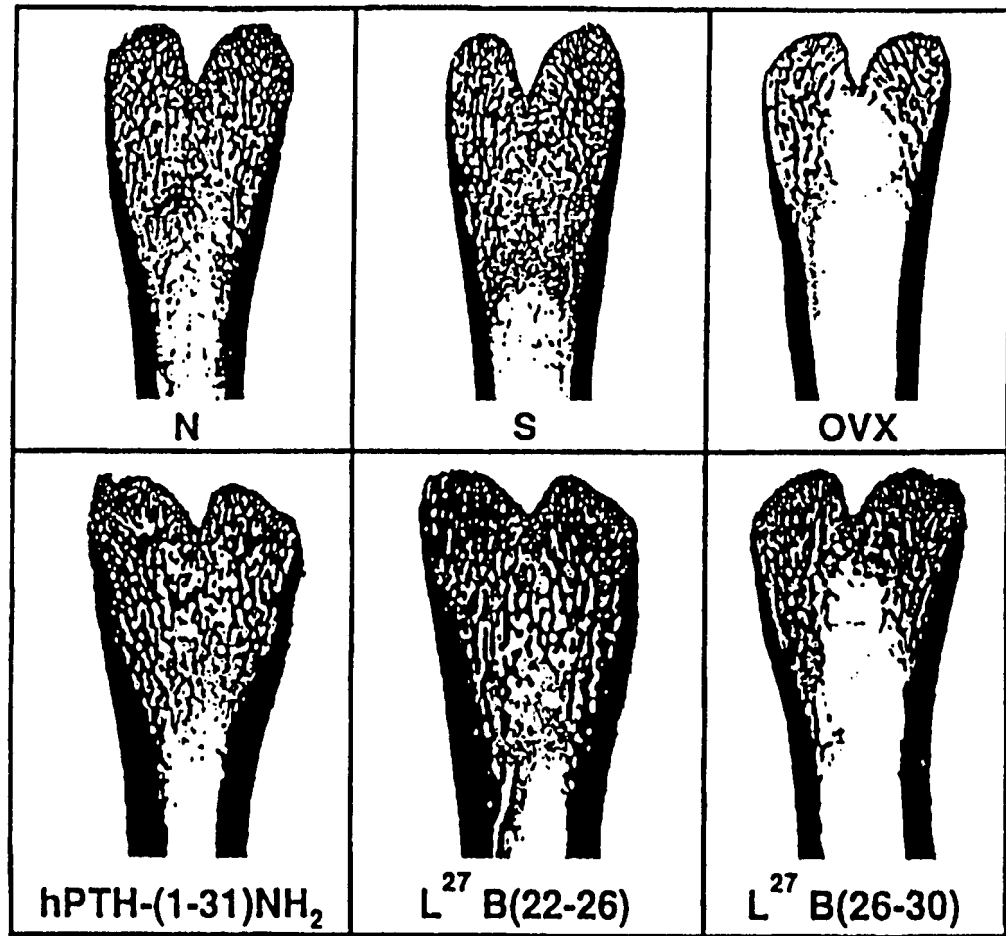


Fig. 5

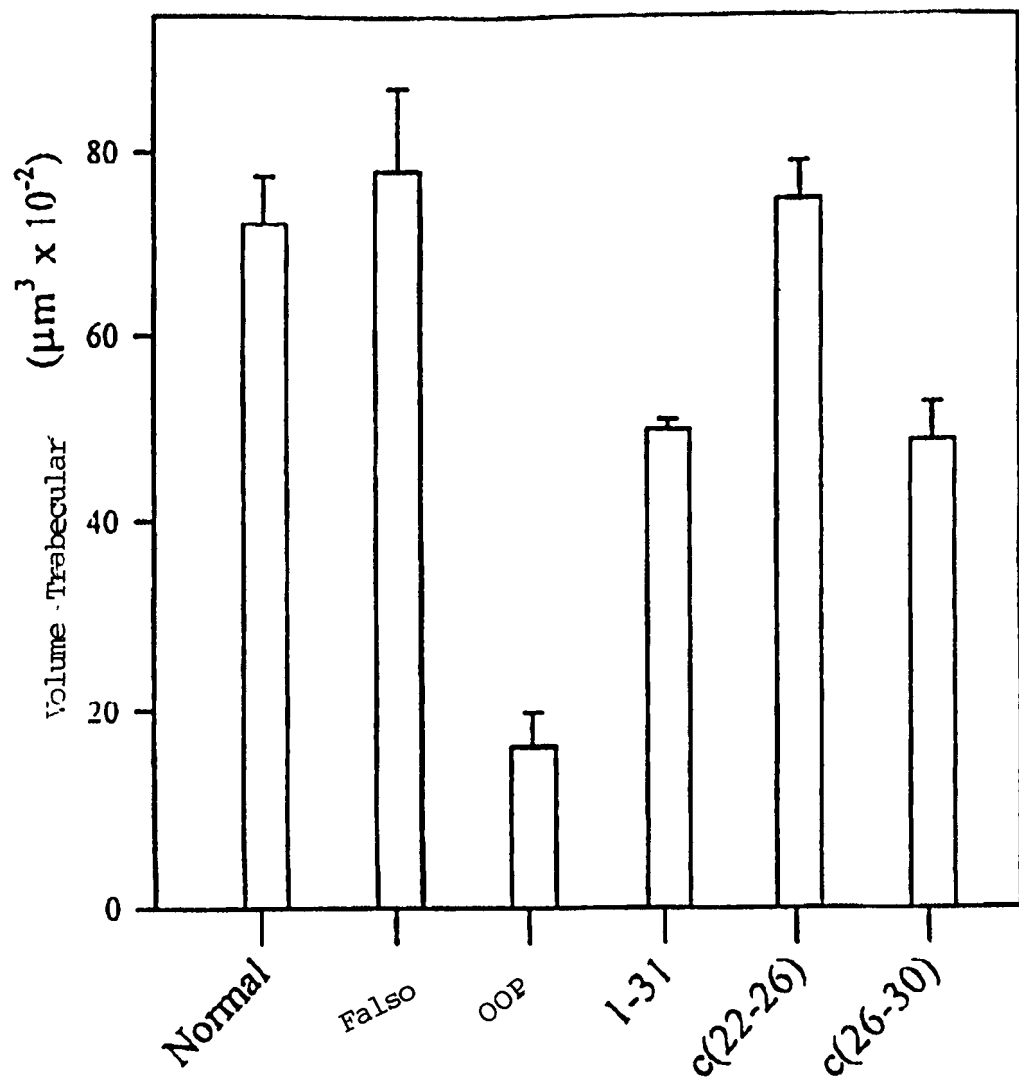


Fig. 6

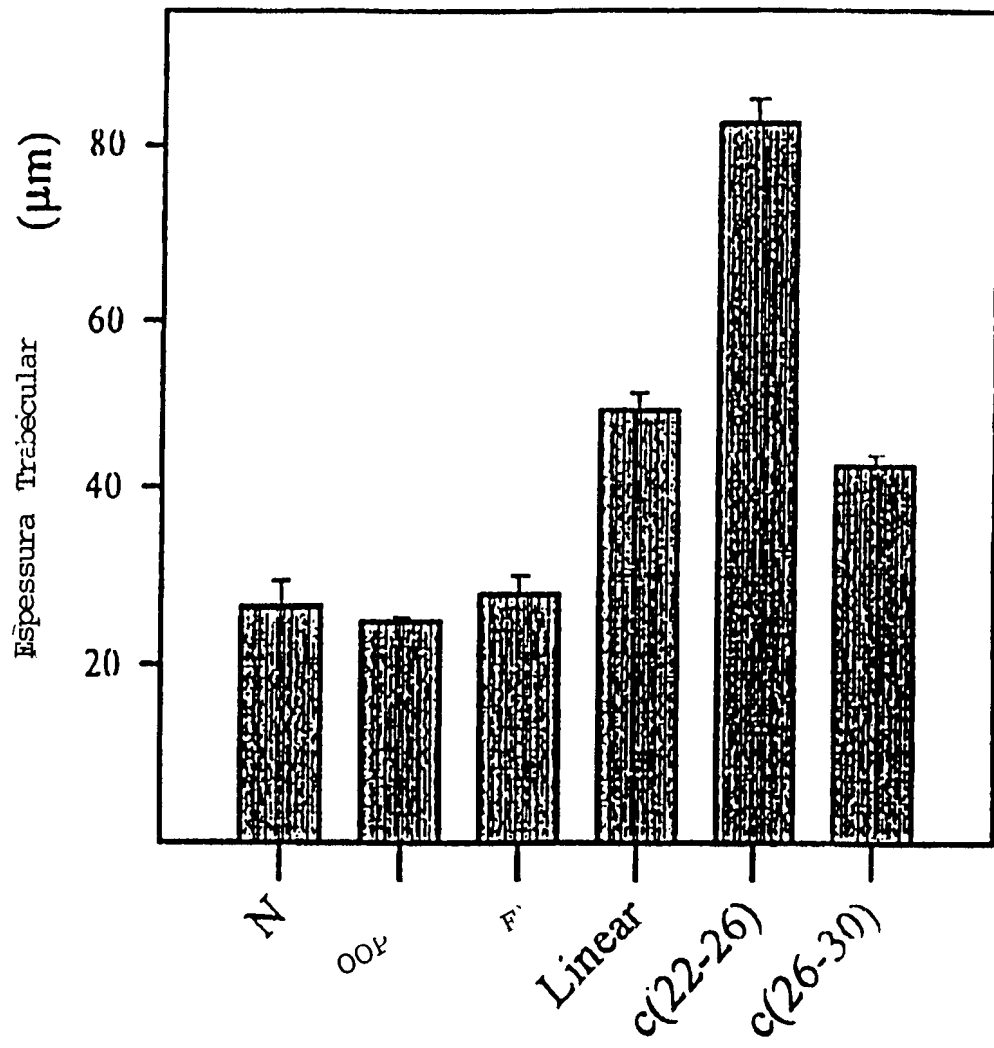


Fig. 7

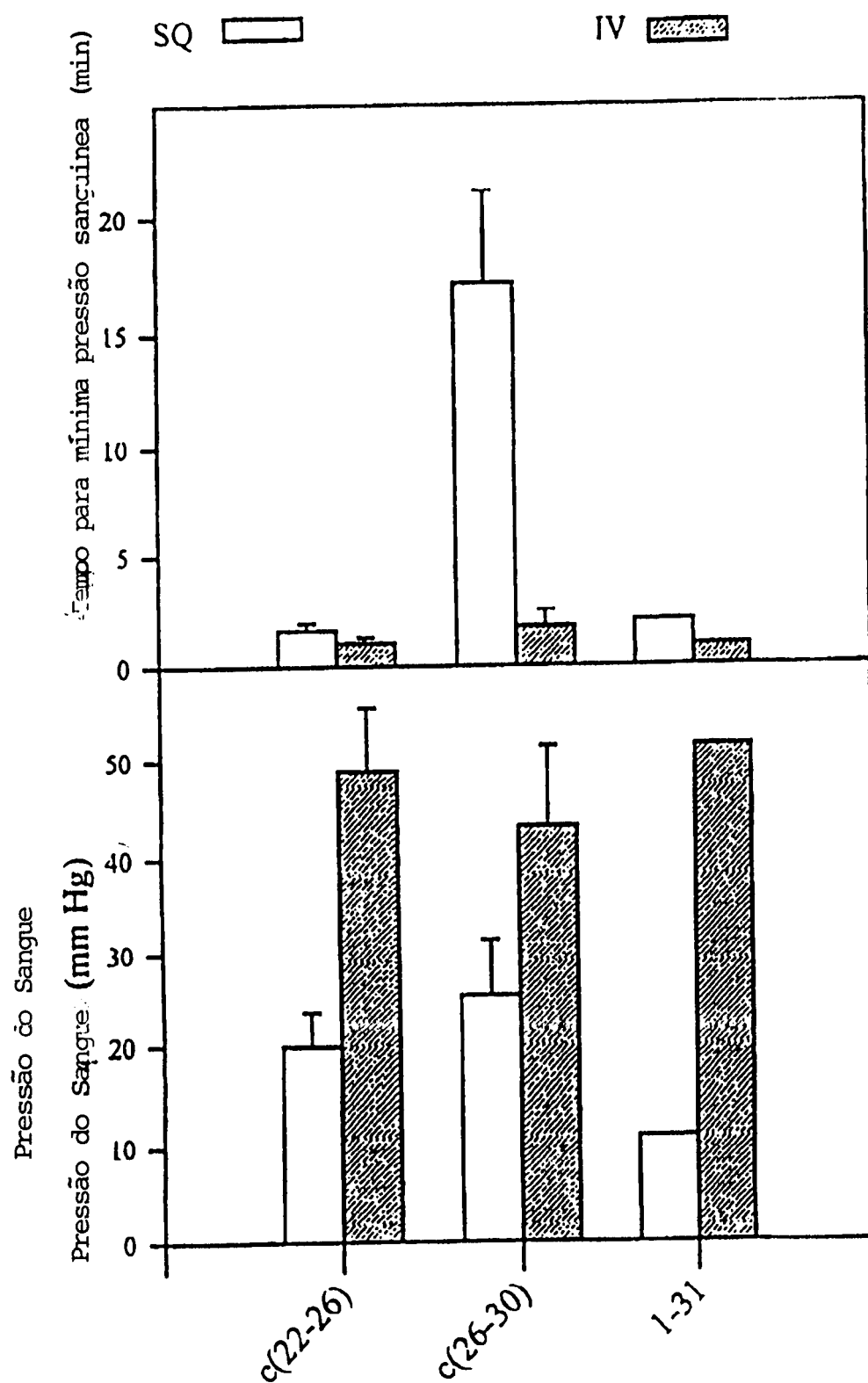


Fig. 8

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

Fig. 9

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

Fig. 10

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

Fig. 11

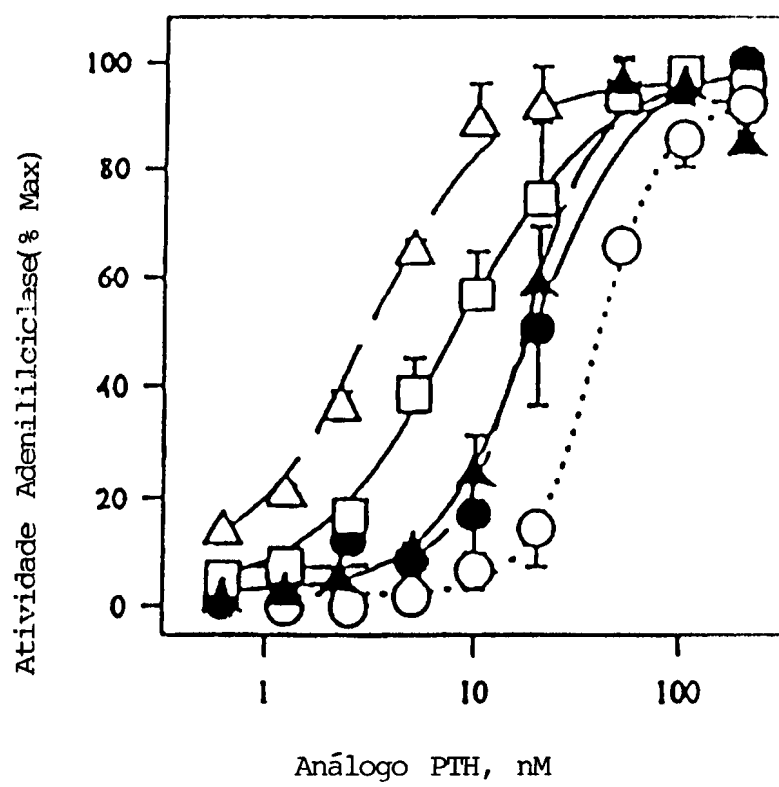


Fig. 12

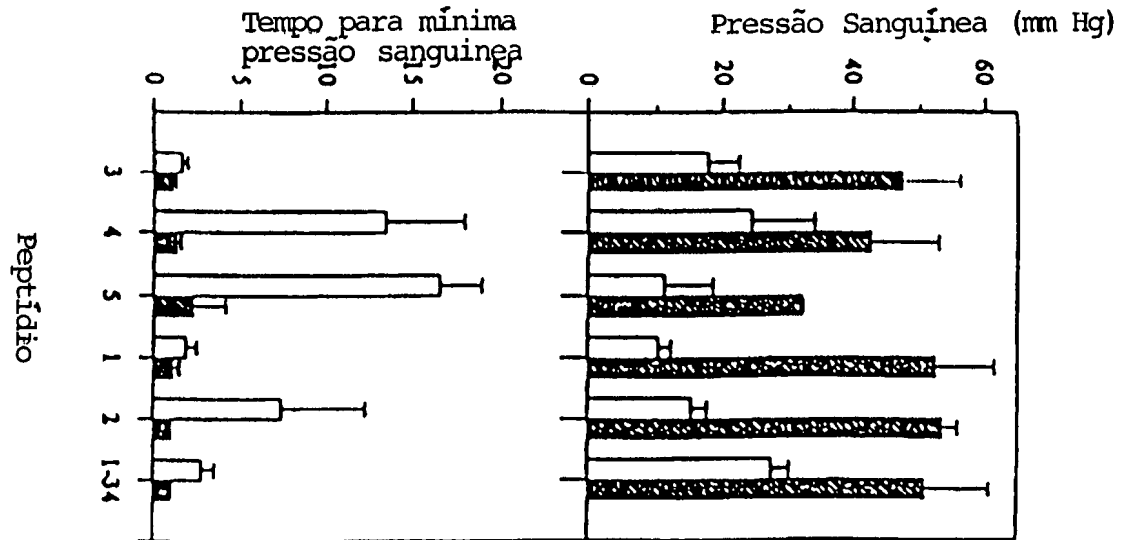
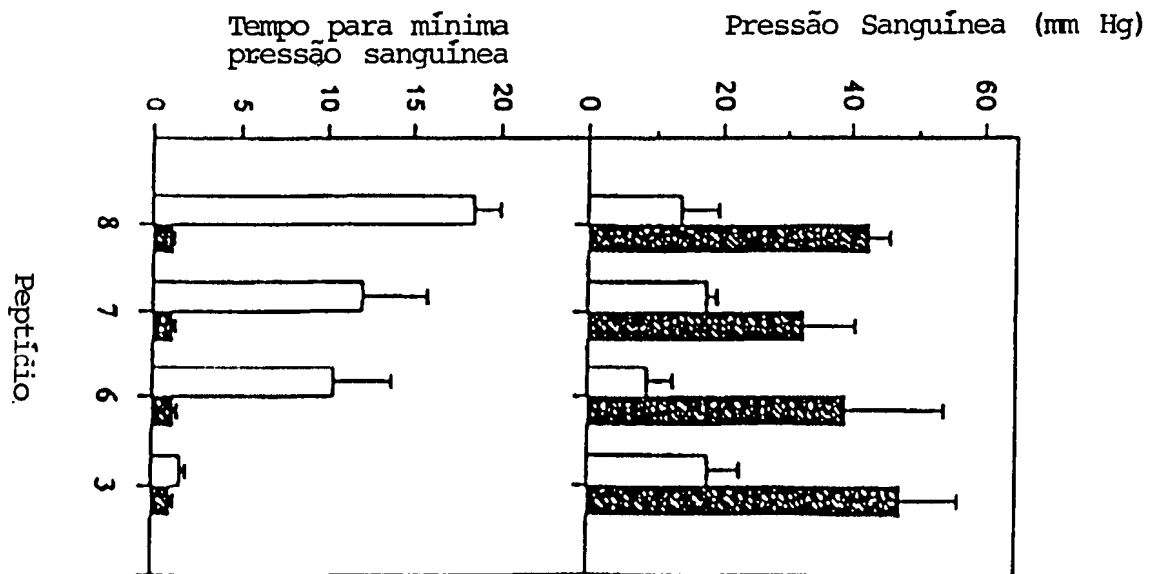
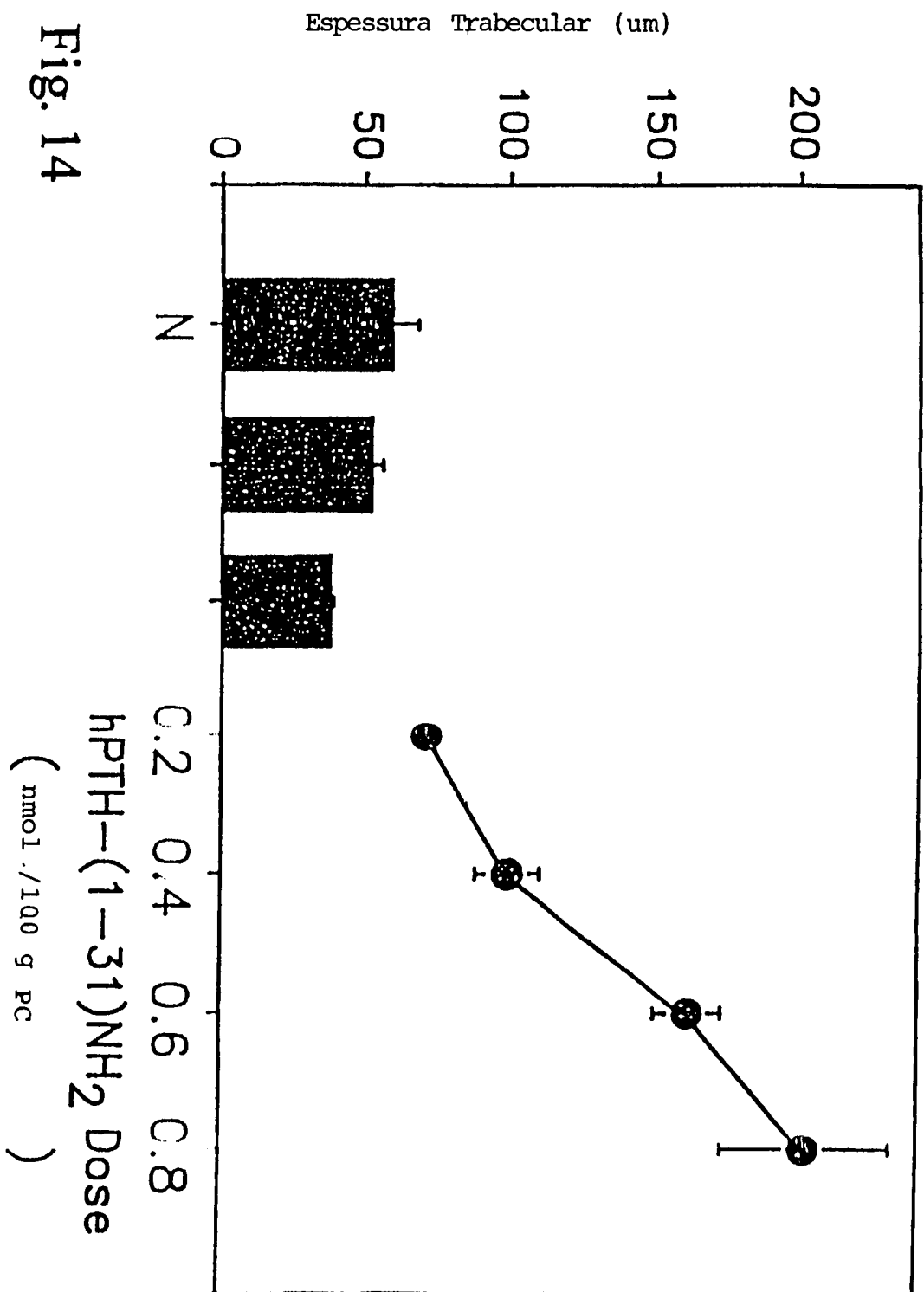


Fig. 13





$\text{H}_2\text{N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-Val-}$
 $\text{Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-OH}$

Fig. 15

$\text{H}_2\text{N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-}$
 $\text{Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-NH}_2$

Fig. 16

$\text{H}_2\text{N-Ser-Val-Ser-Glu-ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-Glu-Arg-}$
 $\text{Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe-OH}$

Fig. 17

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

Fig. 18

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

Fig. 19

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

Fig. 20

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

Fig. 21

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

Fig. 22

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

Fig. 23

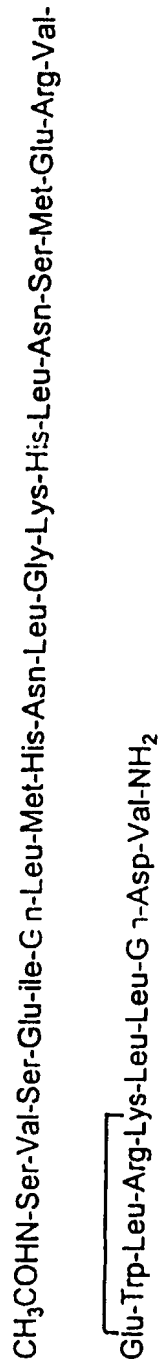


Fig. 24

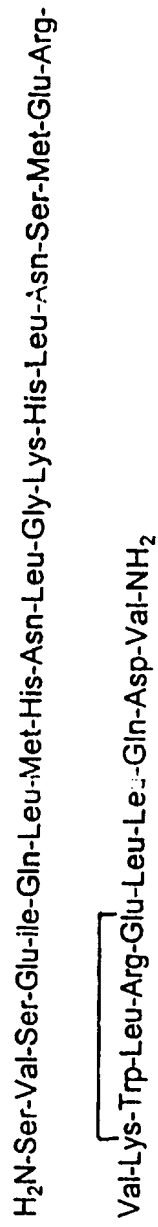


Fig. 25

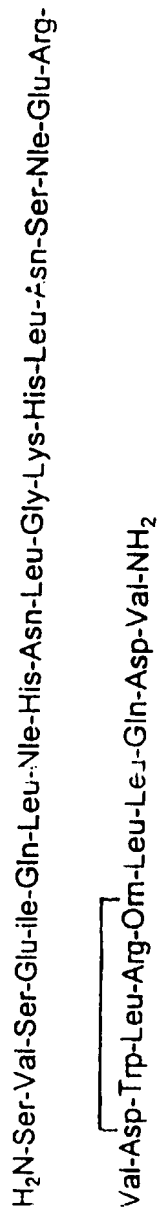


Fig. 26

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

Fig. 27

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

Fig. 28

RESUMO

ANÁLOGOS AO HORMÔNIO DA PARATIREÓIDE PARA O

TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE são descritos nesta invenção os quais aumentam as atividades de restauração dos ossos e aumentam a biodisponibilidade. Os peptídeos descritos são derivados do hPTH-(1-31) os quais são ciclizados por exemplo, pela formação de Lactams entre ambos Glu²² e Lys²⁶ ou Lys²⁶ e Asp²⁰. Ainda, Lys²⁷ natural pode ser substituído por um Leu ou outro resíduo hidrofóbico, tal como Ile, , norleucina, Met, Val, Ala, Trp, ou Phe. Tipicamente, estes análogos tiveram desenvolvidas habilidades para estimular a formação de osso em células de rato com osteosarcoma, e mostra aumento de atividades na restauração de ossos, usando o modelo de rato ovariectomizado. Os análogos também demonstram aumento de atividades e biodisponibilidades, como demonstrado pelos efeitos hipotensivos nos ratos. Um ensaio que relaciona a atividade hipotensiva com a atividade osteogênica é também descrito.