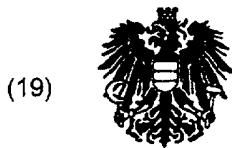


AT 408 100



(19)

**REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt**

(10) Nummer: **AT 408 100 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 9039/93
EP93/01749
(22) Anmeldetag: 06.07.1993
(42) Beginn der Patentdauer: 15.01.2001
(45) Ausgabetag: 27.08.2001

(51) Int. Cl.⁷: **C07K 14/635**
C12N 15/62, 15/63, C12P 21/02,
A61K 38/29

(30) Priorität:
15.07.1992 GB 9215009 beansprucht.
18.12.1992 GB 9226415 beansprucht.
23.12.1992 GB 9226861 beansprucht.
23.12.1992 GB 9226859 beansprucht.
28.01.1993 GB 9301691 beansprucht.
28.01.1993 GB 9301692 beansprucht.
14.04.1993 GB 9307673 beansprucht.
19.04.1993 GB 9308033 beansprucht.

(56) Entgegenhaltungen:
WO 90/10067A (GBF) EP 301485A1 (GBF)
EP 293 158 A2 (MERCK & CO. INC)
EP 477 885 A2 (TAKEDA CHEMICAL
INDUSTRIES, LTD.)
FR 2550204A1 (TOYO JOZO K.K.)
ENDOCRINE RESEARCH COMM., 2(8)1975,
SEITEN 561-570
BIOCHEMISTRY, 29(43)1990, SEITEN 10080-
10089
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,
263(3)1988, SEITEN 1307-1313

(73) Patentinhaber:
NOVARTIS-ERFINDUNGEN
VERWALTUNGSGES.M.B.H.
A-1235 WIEN (AT).
(72) Erfinder:
BAUER WILFRIED
LAMPENBERG (CH).
BRECKENRIDGE ROBIN DR.
MUTTENZ (CH).
CARDINAUX FRANCOIS DR.
SEEWEN (CH).
GOMBERT FRANK DR.
HUTTINGEN (DE).
GRAM HERMANN DR.
WEIL-HALTINGEN (DE).
RAMAGE PAUL DR.
REINACH (CH).
SCHNEIDER HELMUT DR.
FREIBURG (DE).
WAELCHLI RUDOLF DR.
BASEL (CH).
ALBERT RAINER DR.
BASEL (CH).
LEWIS IAN DR.
RIEHEN (CH).

(54) PTH-ANALOGA

(57) PTH Verbindungen, die eine PTH-ähnliche Aktivität aufweisen und zumindest eine Modifikation umfassen, wobei diese Modifikation entweder ist

1. zumindest ein Rest, der aus einer L- oder D- α -Aminosäure, C₂₋₈Alkoxycarbonyl und wahlweise substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist und der an die endständige Aminogruppe der PTH Verbindung gebunden ist und/oder zumindest ein Rest, der aus C₂₋₈Alkoxycarbonyl und wahlweise substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist und der an eine oder mehrere Seitenkettenamino-gruppen der PTH Verbindung gebunden ist,

oder

2. zumindest eine α -Aminosäureeinheit in den Positionen 1 bis 38 einer natürlich auftretenden PTH Sequenz, die durch eine natürliche oder unnatürliche Aminosäureeinheit wahlweise in geschützter Form ersetzt ist, wobei die in den Positionen 1 und 2 des Aminotermminus der PTH Sequenz vorkommenden α -Aminosäureeinheiten zusammen durch ein Pseudopeptid ersetzt sein können,

oder eine Kombination solcher Modifikationen,
in freier Form oder in Salzform,
und pharmakologische Aktivität aufweisen, beispielsweise zur
Prävention oder Behandlung aller Knochenzustände, die mit
einem erhöhten Calciumverlust oder einer erhöhten Resorption
zusammenhängen, oder bei denen die Calciumfixierung im Knochen
wünschenswert ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft Varianten des Parathormons (PTH), ein Verfahren zu deren Herstellung, pharmazeutische Zusammensetzungen, die sie enthalten, und ihre Verwendung als Pharmazeutikum. Verbindungen dieses Typs sind z.B. aus WO 92 11286 bekannt.

Der Ausdruck "PTH", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf jede genetisch kodierte Form eines Parathormons, einschließlich der reifen 84 Aminosäuren enthaltenden Form einer gegebenen PTH Art eines Vertebraten, beispielsweise Mensch, Schwein, Ratte, Rind, Huhn und Fragmente hiervon, wie auch Analoga und Derivate hiervon mit PTH-ähnlicher Aktivität. Die Position jeder in der PTH Sequenz beteiligten Aminosäure wird gemäß der international anerkannten Weise numeriert. In Übereinstimmung und wie es üblich ist, wird in der folgenden Beschreibung das gleiche Numerierungssystem auf die Aminosäuren der PTH Sequenz unabhängig vom Substitutionsmuster im Molekül angewendet.

Genauer gesagt liefert die vorliegende Erfindung eine PTH Verbindung, die eine PTH-ähnliche Aktivität aufweist, der Formel I

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-R₁-His-R₂-R₃-Gly-R₄-His-Leu-R₅-R₆-R₇-R₈-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-
15 R₉-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-R₁₀-R₁₁-(R₁₂)_n-X |
worin

R₁ Met oder Leu ist;
R₂ Asn, Asp, Gly, Gln, Glu, His, Ser, Thr oder Tyr ist;
R₃ Leu oder Lys ist;
R₄ Lys oder D- oder L-Ala, -Cys, -Gln, -Ile, -Asn, -Trp, -Asp, -Val, -Thr, -Ser, -Tyr, -Met, -Leu oder
20 Gly ist;
R₅ Asn, Gln, D-Gln oder D- oder L-Lys, -Ser, -Leu, -Ala oder -Gly ist;
R₆ Ser, Asp, Ala, Glu, Gln, Phe, His, Ile oder Lys ist;
R₇ Gln ist;
R₈ Glu, Arg, Ala, Val, Tyr, Ser, Lys, Met, His, Gly, Pro, Asn oder Ile ist,
R₉ Lys, Gln oder Arg ist;
R₁₀ Asn, Thr, D-Thr oder D- oder L-Ser, -Leu, -Gly, -Gln, -Arg, -Pro, -Asp, -Ile oder -Lys ist;
vorzugsweise Thr;
R₁₁ Phe oder Ala ist; vorzugsweise Ala;
30 R₁₂ Val, Val-Ala, Val-Ala-Leu oder Val-Ala-Leu-Gly ist,
n 0 oder 1 ist; und
X OH, OR_a, NH₂ oder NR_bR_c ist, worin R_a C₁₋₄alkyl ist, eines von R_b und R_c für Wasserstoff steht
und das andere für einen C₁₋₆alkyl steht,
vorausgesetzt, dass R₇ Gln oder Tyr ist und/oder R₁₀ Thr ist und/oder R₁₁ Ala ist, die Verbindung
35 zumindest einen Rest enthält, der aus einer L- oder D-α-Aminosäure, C₂₋₆Alkoxy carbonyl und sub-
stituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl aus-
gewählt ist und der an die endständige Aminogruppe der PTH Verbindung gebunden ist,
und/oder
die Verbindung zumindest einen Rest enthält, der aus C₂₋₆Alkoxy carbonyl und substituiertem
40 C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist
und der an eine oder mehrere Seitenkettenaminogruppen der PTH Verbindung gebunden ist,
in freier Form oder in Salzform oder in Komplexform.

Später werden diese Verbindungen als erfindungsgemäße Verbindungen bezeichnet.

"Natürliche Aminosäuren" beziehen sich auf jene, die im Fachgebiet gut bekannt sind. In der U.S.P.T.O Veröffentlichung, Trademark Official Gazette, herausgegeben am 15. Mai 1990, Seiten 33 bis 46 werden sie und die Standardabkürzungen aufgelistet. Diese Aminosäuren und Abkür-
zungen werden hiermit eingeführt.

Die natürlichen Aminosäuren sind im folgenden angegeben:

50	A	Ala	Alanin
	D	Asp	Asparaginsäure
	E	Glu	Glutaminsäure
	F	Phe	Phenylalanin
	G	Gly	Glycin
55	H	His	Histidin

	I	Ile	Isoleucin
	K	Lys	Lysin
	L	Leu	Leucin
	M	Met	Methionin
5	N	Asn	Asparagin
	Q	Gln	Glutamin
	R	Arg	Arginin
	S	Ser	Serin
	T	Thr	Threonin
10	V	Val	Valin
	W	Trp	Tryptophan
	Y	Tyr	Tyrosin

15 Mit Aminosäuren in geschützter Form sind natürliche oder unnatürliche Aminosäuren gemeint, die beispielsweise eine Seitenkette enthalten, die ein Heteroatom, wie O, S oder N enthält, das mit einer O-, S- oder N-Schutzgruppe geschützt sein kann. Der N-Terminus der erfindungsgemäßen PTH Verbindungen kann ebenfalls in geschützter Form vorliegen.

20 N-Schutzgruppen, wie sie am N-Terminus oder an Seitenkettenaminogruppen von Aminosäureeinheiten vorkommen können, umfassen solche Gruppen, wie sie beispielsweise in "Protective Groups in Organic Synthesis", T.W. Greene, J. Wiley & Sons NY (1981), 219-287 beschrieben sind, beispielsweise Acyl, wie Formyl, Acetyl, Trifluoracetyl, Methoxysuccinyl, Hydroxysuccinyl oder Benzoyl wahlweise am Phenylring mit beispielsweise p-Methoxycarbonyl, p-Methoxy, p-Nitro oder p-Phenylsulfonamidcarbonyl substituiert, Alkoxy carbonyl, wie t-Butyloxycarbonyl, Isobutyloxycarbonyl oder Methoxycarbonyl, Allyloxycarbonyl, Trityl, 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl, Arylmethoxycarbonyl, wie 9-Fluorenylmethoxycarbonyl oder Benzyloxycarbonyl wahlweise am Phenylring mit p-Methoxy, p-Nitro, o- oder p-Chlor, m-Phenyl oder 3,4-Dimethyl substituiert, Arylmethyl, wie Benzyl wahlweise ringsubstituiert mit p-Methoxy, p-Nitro oder p-Chlor, oder Arylsulfonyl, wie Phenylsulfonyl wahlweise ringsubstituiert mit p-Methyl oder p-Methoxy, oder Naphthylsulfonyl wahlweise ringsubstituiert mit beispielsweise Amino oder Di(C₁₋₄Alkyl)amino.

30 O-Schutzgruppen von O-enthaltenden Seitenketten sind beispielsweise die, wie sie in der obigen Literaturstelle "The Peptides", 3, (1981), E.Gross und J. Meienhofer (Herausgeber) beschrieben sind. Für funktionelle aliphatische Hydroxygruppen sind geeignete O-Schutzgruppen die, wie sie beispielsweise in "Protection of the Hydroxy Group", J.M. Stewart, 169-201 beschrieben sind, und beinhalten die Benzyl-, t-Butyl- und Methylgruppen. Für funktionelle aromatische Hydroxygruppen beinhalten geeignete O-Schutzgruppen die Benzyl-, t-Butyl-, Methyl-, Tosyl- und Benzyloxycarbonylgruppen. O-Schutzgruppen für funktionelle Carboxygruppen an Aminosäureseitenketten sind gut bekannte Estergruppen und sind beispielsweise in "The Peptides", 3, 101-135 ("Carboxyl Protecting Groups" von R.W. Roeske) beschrieben und beinhalten die Methyl-, Ethyl-, t-Butyl- und Benzylgruppen. S-Schutzgruppen für funktionelle Thiolgruppen an Aminosäureseitenketten sind gut bekannt und beispielsweise in "The Peptides", 3, 137-167 ("Sulphydryl Group Protection" von R.G. Hiskey) beschrieben. Beispiele beinhalten die Methyl-, t-Butyl-, Benzyl-, p-Methoxyphenylmethyl-, Ethylaminocarbonyl- und Benzyloxycarbonylgruppen.

45 Gemäß der Erfindung können die PTH Verbindungen an ihren endständigen Aminogruppen zumindest einen Rest tragen, der aus einer L- oder D- α -Aminosäure, C₂₋₆Alkoxy carbonyl und wahlweise substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist und/oder an einer oder mehreren Seitenkettenaminogruppe(n) zumindest einen Rest tragen, der aus C₂₋₆Alkoxy carbonyl und wahlweise substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist. Falls eine solche Gruppe an eine Seitenkettenaminogruppe gebunden ist, ist es vorzugsweise die ϵ -Aminogruppe einer Lys Einheit. Bevorzugte Substituenten für die Alkyl, Alkenyl, Aralkyl, Aralkenyl oder Cycloalkylgruppe sind Hydroxy, Amino und für den Arylteil auch Halogen und/oder C₁₋₄Alkoxy. Die Alkylgruppe oder der Alkylteil kann linear oder verzweigt und wahlweise durch O, S oder N unterbrochen sein. Vorzugsweise ist jedes C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, Aralkyl, Aralkenyl oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl an der Aminogruppe einer PTH Verbindung nicht substituiert. Beispiele für C₁₋₈Alkyl sind C₁₋₆Alkyl, vorzugsweise Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, t-Butyl, für C₂₋₈Alkenyl sind es C₂₋₄Alke-

nyl, vorzugsweise Allyl, für C₂₋₈Alkanyl sind es C₂₋₄Alkanyl, vorzugsweise Prop-2-inyl, für Aralkyl sind es Phenyl oder Benzyl, für Aralkenyl ist es Styryl, für C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ist es Cyclohexylmethyl. C₂₋₆Alkoxy carbonyl ist vorzugsweise Formyl oder Acetyl. Geeignete Beispiele für D- oder L- α -Aminosäuren, die an den N-Terminus gebunden sind, beinhalten beispielsweise D- oder L-Pro und Ala. Bevorzugte Substituenten, wenn sie vorkommen, sind Alkyl, Alkanyl, Alkoxy carbonyl oder eine an den N-Terminus der PTH Verbindung gebundene D- oder L- α -Aminosäure und/oder zu mindest ein Alkyl oder Alkoxy carbonyl, das an eine oder mehrere Seitenkettenaminogruppen gebunden ist.

Bevorzugte erfindungsgemäße PTH Verbindungen sind jene, die ausgewählt sind aus

- [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]PTH(1-x'),
- [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]PTH(1-x'),
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]PTH(1-x'),
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]PTH(1-x'),
- [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]PTH(1-x'),
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]PTH(1-x'),
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]PTH(1-x'),
- [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]PTH(1-x'), und
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]PTH(1-x'),

worin x' eine Zahl von 34 bis 38 bedeutet, insbesonders 34, 36, 37 oder 38, und umfassen z.B. PTH Verbindungen die ausgewählt sind aus

- [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH;
- [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH;
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH;
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH;
- [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH;
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH;
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH;
- [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH; und
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH; wobei

die Verbindung zumindest einen Rest enthält, der aus einer L- oder D- α -Aminosäure, C₂₋₆Alkoxy carbonyl und substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkanyl, Aralkyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist und der an die endständige Aminogruppe der PTH Verbindung gebunden ist,

und/oder

die Verbindung zumindest einen Rest enthält, der aus C₂₋₆Alkoxy carbonyl und substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkanyl, Aralkyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl, ausgewählt ist und der an eine oder mehrere Seitenkettenaminogruppen der PTH Verbindung gebunden ist, in freier Form oder in Salzform oder in Komplexform

- und
- [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
- [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
- [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH;
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH;
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
- [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH(1-34)OH, und
- [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH,

in freier Form oder in Salzform oder in Komplexform.

Vorzugsweise ist PTH(1-x') hPTH(1-x').

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können beispielsweise in freier Form, Salzform oder in Form von Komplexen hiervon vorkommen. Säureadditionssalze können beispielsweise mit organischen Säuren, Polymersäuren und anorganischen Säuren gebildet werden. Solche Säureadditionssalzformen beinhalten beispielsweise die Hydrochloride und die Acetate. Komplexe werden beispielsweise aus der erfindungsgemäßen Verbindung durch die Zugabe von anorganischen Sub-

stanzen, beispielsweise anorganischen Salzen oder Hydroxiden, wie Ca- und Zn-Salzen, und/oder durch die Zugabe von polymeren organischen Substanzen gebildet.

Die vorliegende Erfindung liefert auch ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen. Sie können schrittweise entweder in Lösung oder mittels Festphasensyntheseverfahren oder Gentechnologie hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können beispielsweise folgendermaßen hergestellt werden:

a) Entfernung von zumindest einer Schutzgruppe, die in einer geschützten erfindungsgemäßen Verbindung vorkommt, oder

b) Zusammenfügung von zwei Peptidfragmenten durch eine Amidbindung, wobei die Peptidfragmente so beschaffen sind, daß die gewünschte Aminosäuresequenz der gewünschten Verbindung erhalten wird, und dann die Ausführung des wahlweisen Schritts a) des Verfahrens,

c) zur Herstellung einer PTH Verbindung, die zumindest einen Rest enthält, die aus einer an den N-Terminus gebundenen L- oder D- α -Aminosäure und C₂₋₆Alkoxy carbonyl und wahlweise substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist und der an die endständige Aminogruppe und/oder eine Seitenkettenaminogruppe gebunden ist, Einführung eines solchen Rests in eine PTH Verbindung, die in geschützter oder ungeschützter Form vorliegt und keinen solchen Rest enthält, und falls erforderlich Ausführung von Schritt a), und Gewinnung der so erhaltenen Verbindungen in freier Form, Salzform oder in Komplexform.

Die Verfahrensschritte a), b) und c) können in Analogie zu bekannten Verfahren bewirkt werden, wie es beispielsweise im Fachgebiet der Peptidchemie bekannt ist oder in den folgenden Beispielen beschrieben wird. Falls gewünscht können in diesen Reaktionen zur Verwendung bei Peptiden geeignete Schutzgruppen für funktionelle Gruppen verwendet werden, die nicht an der Reaktion beteiligt sind. Der Ausdruck Schutzgruppe kann auch ein Polymerharz beinhalten, das funktionelle Gruppen aufweist.

Der Verfahrensschritt c) kann in Analogie zu bekannten Verfahren, beispielsweise Alkylierungsverfahren, ausgeführt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Alkylierung unter reduktiven Bedingungen ausgeführt, beispielsweise mittels eines entsprechenden Aldehyds oder Ketons. Sie kann beispielsweise in Gegenwart von NaBH₃CN ausgeführt werden, vorzugsweise bei einem sauren pH, beispielsweise von 5 bis 7. Die Temperatur der Reaktion kann von beispielsweise -20°C bis 100°C betragen. Es kann vorteilhaft sein, die Reaktion in einem inneren Lösemittel auszuführen, beispielsweise Wasser, einem Alkohol, Dioxan oder DMF oder einem Gemisch hiervon. Eine D- oder L- α -Aminosäure kann gemäß dem bekannten Verfahren auch an den N-Terminus gebunden werden.

Das in Verfahrensschritt b) als Ausgangsmaterial verwendete Peptidfragment kann eine oder mehrere unnatürliche Aminosäureeinheiten umfassen, es kann auch am N-Terminus und/oder an den Seitenkettenaminogruppen durch einen Rest substituiert sein, die aus C₂₋₆Alkoxy carbonyl und wahlweise substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist, oder es kann eine D- oder L- α -Aminosäure am N-Terminus tragen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen oder Fragmente hiervon, die natürliche α -Aminosäureeinheiten enthalten, können auch mittels rekombinanter Technologie hergestellt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung eines PTH Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, in dem ein Fusionsprotein in Bakterienzellen exprimiert wird, das ein N-terminales Bakteriophagen T4 Gen 55 enthält, das das gewünschte PTH Polypeptid an der C-Terminus hiervon gebunden aufweist, und wenn nötig, ein C₂₋₆Alkoxy carbonyl oder wahlweise substituierten C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl Rest an die endständige Aminogruppe und/oder Seitenkettenaminogruppe der PTH Verbindung in geschützter oder ungeschützter Form eingeführt wird, und erforderlichenfalls die in der geschützten Form vorkommende Schutzgruppe entfernt wird, zur Verfügung gestellt.

Das Gen 55 Polypeptid kann das gesamte gp55 Protein des Bakteriophagen T4 (188 Aminosäurereste) umfassen, das in H. Gram und R. Rüger, 1985, The EMBO Journal, 4, (1), Seiten 257-264 beschrieben ist. Alternativ dazu kann ein Fragment verwendet werden, vorzugsweise ein N-terminales Fragment des gp55 Proteins. Beispielsweise kann ein gp55 Proteinfragment verwendet werden, das die ersten 112 N-terminalen Aminosäurereste des Proteins umfaßt. Typischer-

weise umfaßt das Gen 55 Polypeptid jedoch mindestens die ersten 25 N-terminalen Reste des gp55 Proteins.

Bequemerweise enthält das Gen 55-PTH Fusionsprotein auch einen spaltbaren Linker zwischen dem Gen 55 Polypeptid und dem gewünschten Polypeptid. Vorzugsweise ist der spaltbare Linker chemisch spaltbar und noch bevorzugter enthält er die Aminosäuresequenzen Asp-Pro-Pro oder Asn-Gly-Pro.

In einem weiteren Aspekt liefert die Erfindung eine Nukleotidsequenz, die für ein Fusionsprotein kodiert, das ein N-terminales Bakteriophagen T4 Gen 55 Polypeptid und eine gewünschte PTH Verbindung gemäß vorliegender Erfindung, an den C-Terminus hiervon gebunden enthält.

Die Nukleotidsequenz ist vorzugsweise eine DNA Sequenz, die zur Expression in Bakterien geeignet ist. Diese Sequenz enthält typischerweise Nukleotide zwischen den für das Gen 55 und den das gewünschte Polypeptid kodierenden Sequenzen, die für einen spaltbaren Linker kodieren.

Die Erfindung liefert auch einen bakteriellen Expressionsvektor, der eine für das Fusionsprotein kodierende DNA Sequenz enthält.

Der Expressionsvektor enthält typischerweise zusätzlich zur kodierenden Sequenz des Fusionsproteins geeignete Expressionskontrollsequenzen, einschließlich eines geeigneten Promoters, eines Operators und einer Ribosomenbindungsstelle und anderen geeigneten regulatorischen Sequenzen. Gewöhnlich enthält der Expressionvektor auch einen oder mehrere Selektionsmarker.

Jeder geeignete Promotor kann verwendet werden, wie der TrpE, Lambda PI, Lambda Pr, lac oder Tac Promotor. Vorzugsweise ist der Promotor der Bakteriophagen T7 Promotor und der Expressionsvektor ein Plasmid. Zur E. coli Expression kann ein Vektor verwendet werden, der vom R1 oder Col-E1 Plasmid abstammt. Beispielsweise können der von Novagen erhältliche Expressionsvektor pET 17B oder ähnliche Vektoren verwendet werden.

In einem weiteren Aspekt liefert die Erfindung bakterielle Wirtszellen, die mit einer ein Fusionsprotein kodierenden Sequenz oder einem wie oben beschriebenen Expressionsvektor transformiert sind. Jede geeignete bakterielle Wirtszelle kann verwendet werden, obwohl der Wirt vorzugsweise E. coli ist. Beispielsweise können der E. coli Stamm BL21 (DE3) Lys E und ähnliche Stämme verwendet werden.

Vorteilhafterweise reichert sich das Fusionsprotein innerhalb der Wirtszellen in Form von unlöslichen Einschlußkörpern an und erleichtert daher die Gewinnung des Fusionsproteinprodukts aus den Zellen. Um das gewünschte Polypeptidprodukt aus dem Fusionsprotein zu gewinnen, wird das Protein der Einschlußkörper gelöst, und das gewünschte Polypeptidprodukt vom Fusionsprotein abgespalten. Jede geeignete Lösungsbehandlung kann verwendet werden, einschließlich Säurebehandlung beispielsweise bei etwa pH 2 bis 4, vorzugsweise mit Säure bei etwa pH 2,5, oder die Behandlung mit einem denaturierenden Mittel, beispielsweise einem milden Denaturierungsmittel, wie Guanidinhydrochlorid. Zusätzlich kann es notwendig sein, eine oder mehrere gewünschte N-terminale Aminosäurereste vom Produkt zu entfernen, die nach der Spaltung verblieben sind.

Daher liefert die Erfindung in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß vorliegender Erfindung in einem bakteriellen Wirt, wobei das Verfahren gekennzeichnet ist durch:

Veranlassung der wie oben definierten transformierten bakteriellen Wirtszellen, das Fusionsprotein in Form von Einschlußkörpern zu exprimieren,

Isolierung der Einschlußkörper,

Auflösen der Einschlußkörper, und

Abspaltung des gewünschten Polypeptids vom Fusionsprotein.

Im Fall von PTH Verbindungen, ist es normalerweise nicht notwendig, sorgfältig kontrollierte Denaturierungs- und Renaturierungsverfahren zur Bildung von PTH Produkten in aktiver Form, beispielsweise mit PTH-ähnlicher Aktivität, auszuführen. Die mittelgroßen Polypeptidprodukte können in aktiver Form meistens durch Neutralisierung des zur Auflösung verwendeten sauren Bedingungen erhalten werden. Die Lösung und Spaltung des Fusionsproteins kann in einem einzigen Schritt ausgeführt werden.

Die Erfindung beinhaltet auch ein Fusionsprotein, das ein N-terminales Bakteriophagen T4 Gen 55 Polypeptid und an den C-Terminus hiervon gebunden eine PTH Verbindung gemäß vorliegender Erfindung umfaßt.

Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren und Vektoren wurde festgestellt,

daß es möglich ist, große Mengen an PTH Produkten zu produzieren. In *E. coli* wurde festgestellt, daß bis zu etwa 50 % des exprimierten Gesamtproteins das gewünschte Fusionsprotein ist. Ebenfalls, daß das Fusionsprotein Einschlußkörper bildet, die leicht vom anderen Zellmaterial zu trennen sind. Darüberhinaus bestehen die Einschlußkörper oft aus zumindest etwa 90 % des gewünschten Fusionsproteins, was den erforderlichen Reinigungsaufwand deutlich reduzieren kann. Ferner kann die Expression des PTH Produkts in der Form des Fusionsproteins das endogene Prozessieren des Polypeptids in der Bakterienzelle wesentlich reduzieren, was die Erhaltung von homogenen Produkten erlaubt.

Vorzugsweise enthält der spaltbare Linker chemisch spaltbare Aminosäuren benachbart zum N-Terminus des gewünschten Polypeptids, um die Abspaltung des gewünschten Polypeptids vom Fusionsprotein durch einfache chemische Mittel zu erlauben. Vorzugsweise enthält das gewünschte Polypeptid die chemisch spaltbaren Gruppen nicht.

Bevorzugte chemisch spaltbare Linker enthalten die Aminosäuren Asp-Pro-Pro oder Asn-Gly-Pro. Die Asp-Pro oder Asn-Gly Bindungen können chemisch mittels saurer Bedingungen gespalten werden, beispielsweise jeweils Ameisensäure (normalerweise etwa pH 2,5) oder Hydroxylamin. Die Dipeptide Pro-Pro oder Gly-Pro, die am N-Terminus des gewünschten Polypeptids verbleiben, können dann durch eine geeignete Dipeptidylpeptidase entfernt werden. Beispielsweise kann die *L. lactis* X-Pro-Dipeptidylpeptidase EC 3.4.14.5 verwendet werden. Diese Peptidase ist in Nardi et al, 1991, Applied and Environmental Microbiology, 57, Seiten 45 bis 50 beschrieben.

Das gewünschte Polypeptid kann nach der Abspaltung vom Fusionsprotein gereinigt werden. Hier können HPLC Reinigungstechniken verwendet werden. Die Reinigung kann vor der Entfernung von allen unerwünschten N-terminalen Aminosäureresten ausgeführt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird ferner in den Vergleichsbeispielen 25 bis 31 geschildert, welche sich aber nur auf Fusionsproteine beziehen, umfassend (1-38)PTH, die von der vorliegenden Erfindung nicht umfaßt sind. Die SEQ ID Nr. 1 zeigt die Aminosäuresequenz und die entsprechende DNA Sequenz eines verkürzten gp55-Asp-Pro-Pro-hPTH(1-38)OH Fusionsproteins, wie sie in das Plasmid pET17B kloniert ist, und die SEQ ID Nr. 3 zeigt die Aminosäuresequenz und die entsprechende DNA Sequenz eines Vollängen gp55-Asn-Gly-Pro-hPTH(1-38)OH Fusionsproteins, wie es in das Plasmid pET17B kloniert ist.

In den folgenden Beispielen sind alle Temperaturen in °C angegeben. Die folgenden Abkürzungen werden verwendet:

	BOC	=	tert. Butyloxycarbonyl
	DMF	=	Dimethylformamid
35	DCM	=	Dichlormethan
	Fmoc	=	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
	HOBt	=	1-Hydroxybenztriazol
	TFA	=	Trifluoressigsäure
	Trt	=	Trityl = Triphenylmethyl
40	RP-HPLC	=	Umkehrphasenhochleistungsflüssigchromatographie
	RT	=	Raumtemperatur
	DNP	=	Dinitrophenyl
	Tos	=	Tosyl
	DIPC	=	Diisopropylcarbodiimid
45	Pmc	=	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
	Ip	=	Isopropyl
	For	=	Formyl
	Cpe	=	1-Aminocyclopantan-1-carbonsäure
	Cpp	=	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
50	Cha	=	Cyclohexylalanin
	tBu	=	tert. Butyl

"PTH" in der vorliegenden Anmeldung mit oder ohne weiterer Angabe, schließt sowohl den Carboxy Terminus, als auch den Carboxamid Terminus mit ein.

Vergleichsbeispiel 1: N^a-Isopropyl hPTH(1-34) NH₂

Dieses Peptid wird schrittweise auf einem auf Polystyrol basierenden Harzträger zusammengefügt. Die Boc-Gruppe wird zum Schutz der alpha-Aminogruppe verwendet und die funktionellen Gruppen der Seitenketten werden folgendermaßen geschützt: Lys(2-chlorbenzyloxycarbonyl), Ser(benzyl), Thr(benzyl), Glu(benzyl), Asp(benzyl), Met(O), His(DNP), Arg(Tos) und Trp(HCO). Die anderen Reste bleiben ungeschützt.

Amino-4-methylphenyl-methyl-co(polystyroldivinylbenzol = MBHA-Harz) (0,7 mmol/g) wird dem folgenden Behandlungszyklus der Schritte (1) bis (7) unterzogen:

- 10 (1) DCM
- (2) Trifluoressigsäure (50 %) in DCM
- (3) DCM
- (4) Diisopropylethylamin (10 %) in DMF
- 15 (5) DMF
- (6) vorgebildetes symmetrisches Anhydrid (1,4 mmol pro g Ausgangsharz) der Boc-Aminosäure in DMF
- (7) DMF

20 Die Volumina der Waschschritte und Reagenzien reichen von 5 bis 20 ml pro Gramm Ausgangsharz. Jeder Schritt wird so oft wie nötig wiederholt, um entweder die Reaktion des Harzes zu vervollständigen (Schritte 2, 4, 6) oder die Entfernung des vorherigen Reagenzes vom Harz (Schritte 1, 3, 5, 7) zu vervollständigen. Harzproben werden nach jedem Zyklus entnommen und auf Vollständigkeit der Kupplungsreaktion durch einen colorimetrischen Test auf verbleibende Aminogruppen mittels Ninhydrin getestet.

25 Kurz vor der Verwendung werden symmetrische Anhydride der Boc-Aminosäuren durch Umsetzung der Boc-Aminosäure (2,8 mmol pro g Harz) und DCCI (1,4 mmol pro g Harz) in DCM, das zur vollständigen Auflösung der Boc-Aminosäure in ausreichenden Mengen DMF enthält, hergestellt. Das Gemisch wird filtriert, mehr DMF wird zum Filtrat gegeben, das durch Verdampfen der flüchtigen Bestandteile bei einer Temperatur nicht über 15°C konzentriert wird, und die entstehende Lösung wird in Schritt (6) verwendet.

Der Reaktionszyklus (1) bis (7) wird für jede Aminosäure außer Boc-Gln-OH und Boc-Arg(Tos)-OH wiederholt, die in Schritt (6) als vorgefertigte 1-Hydroxybenztriazolester in DMF angekuppelt werden, um so die Sequenz der Titelverbindung herzustellen.

30 Das komplett zusammengesetzte Peptidharz wird zweimal mit 20 ml 5 % Thiophenol in DMF bei Raumtemperatur für eine Stunde behandelt und mit DMF, Methanol und Dichlormethan gewaschen. Das Peptidharz wird erneut den Schritten (1) bis (5) unterzogen, gefolgt von der Zugabe von 0,5 ml Aceton, 84 mg Natriumcyanborhydrid und 0,2 ml Essigsäure in 20 ml DMF pro Gramm Harz. Nach 16 Stunden bei Raumtemperatur wird das Harz mit DMF und Dichlormethan gewaschen und getrocknet.

35 Das Peptidharz wird mit flüssigem HF, Dimethylsulfid, p-Kresol und Ethan-1,2-dithiol gemäß dem "niedrig-hoch" Verfahren behandelt, das beispielsweise in International Journal of Peptide and Protein Research, Band 26, Seiten 262-273 (1985) beschrieben ist. Nach Entfernung der flüchtigen Bestandteile und Waschen mit Ethylacetat wird der Rückstand mit einigen Portionen 1 %iger Essigsäure extrahiert, filtriert und das Filtrat lyophilisiert. Das lyophilisierte Produkt wird durch wiederholte Umkehrphasenchromatographie auf einer Octadecyl-Kieselgelsäule mittels eines Gradienten aus Acetonitril in 2 % Phosphorsäure oder in 20 mM Tetramethylammoniumphosphat gereinigt. Die die reine Verbindung enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, durch ein schwaches Ionenaustauscherharz in Acetatform filtriert und das Filtrat wird unter Erhaltung der Titelverbindung lyophilisiert. MS (Ionenspray): 4160.

Vergleichsbeispiel 2: [Lys (N^c-Isopropyl)^{26, 27}]hPTH(1-34) NH₂

45 Das Peptid wird wie für Vergleichsbeispiel 1 beschrieben zusammengefügt, aber man verwendet Lys(Fmoc) zum Einbau in die Position 13 und Fmoc-Ser(tBu) in die endständigen Position 1.

Das vollständig zusammengefügte Peptidharz wird zweimal mit 20 ml 5 % Thiophenol in DMF bei Raumtemperatur für 1 Stunde behandelt und mit DMF, Methanol und Dichlormethan gewaschen. Das trockene Harz wird mit flüssigem HF behandelt, wie dies für Beispiel 1 beschrieben ist. Das Spaltprodukt (350 mg) wird in einem Gemisch aus Methanol (5 ml), Phosphatpuffer pH = 5,0 (5 ml), Natriumcyanborhydrid (48 mg) und Aceton (0,28 ml) suspendiert. Nach 16 Stunden bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in 20 %igem Piperidin in DMF für 15 Minuten suspendiert, mit 20 Volumina Ether verdünnt und filtriert. Der Rückstand wird in 100 ml Wasser und bis auf pH = 3 zugegebener Essigsäure gelöst, filtriert und das Filtrat wird lyophilisiert. Das Lyophilisat wird durch Umkehrphasenchromatographie auf einer Octadecyl-Kieselgelsäule gereinigt, indem man einen Gradienten von Acetonitril in 2 % Phosphorsäure verwendet. Fraktionen, die die reine Verbindung enthalten, werden vereinigt, durch ein schwach basisches Ionenaustauscherharz in Acetatform filtriert und das Filtrat unter Erhaltung der Titelverbindung lyophilisiert.

MS (Ionenspray): 4205,6

15

Vergleichsbeispiel 3: N^α-Isopropyl [Lys (N^ε-Isopropyl)]^{13, 26, 27}hPTH(1-38)-OH

a) Festphasenpeptidsynthese

Das Peptid wird schrittweise auf einem Harzträger auf Polystyrolbasis synthetisiert. Die alpha-Aminogruppe wird durch Fmoc geschützt und die funktionellen Gruppen der Seitenkette sind folgende: Asp(OtBu), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Asn(Trt), Gln(Trt), Arg(Pmc) und Ser(tBu). Die anderen Aminosäuren bleiben ungeschützt. Zu 4-Hydroxymethylphenoxyethyl-co(polystyrol 1 %-divinylbenzol) verestertes Fmoc-Gly, 0,5 mmol/g, wird als Ausgangsmaterial für die schrittweise Festphasensynthese verwendet, die aus repetitiven Zyklen mit Abspaltung der Schutzgruppen der alpha-Aminosäure, Waschen, Kuppeln (Anhängen der neuen Aminosäure) und Waschen bestehen. Ein drei bis fünffacher Überschuß an Fmoc-Aminosäuren in Form von vorgefertigten HOBt-Estern wird mittels DIPC gekuppelt. Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-Asn(Trt) und Fmoc-Gln(Trt) werden als symmetrische Anhydride mittels DIPC gekuppelt. Nach dem vollständigen Zusammensetzen der Peptidkette wird die Fmoc-Schutzgruppe von Ser¹ durch 20 % Piperidin/DMF entfernt. Die Abspaltung des Peptids vom Polystyrolharz und die Entfernung aller Schutzgruppen der Seitenketten wird durch die Behandlung des Peptidharzes mit einem Gemisch aus 10 % Ethandithiol, Thioanisol, Thiokresol und Wasser in 90 % TFA für drei Stunden bei Raumtemperatur erreicht. Die Harzpartikel werden wegfiltriert und mit etwas TFA gewaschen. Das Produkt wird aus den vereinigten Filtraten durch die Zugabe von Ether ausgefällt, filtriert und getrocknet. Das Produkt wird dann durch Chromatographie auf einer C-18 Kieselgelsäule mittels eines Gradienten von Acetonitril in 2 % H₃PO₄ / Wasser gereinigt. Die die reine Verbindung enthaltenden Fraktionen werden gesammelt, durch ein Anionenaustauscherharz (Biorad, AG 4-X4, 100-200 Mesh in Acetatform) filtriert und unter Erhaltung von hPTH-(1-38)-OH lyophilisiert.

b) Alkylierung

40 mg (9 µmol) hPTH-(1-38)-OH (4458,2 g/mol) werden in 1,2 ml Methanol, 1,2 ml Phosphatpuffer (Merck Nr. 9887, der auf pH 5,0 eingestellt ist), 45 mg (716 mmol) NaBH₃CN (62,84 g/mol) und 0,8 ml (11 mmol) Aceton (73,52 ml/mol) gelöst. Die Reaktion wird mittels RP-HPLC auf einer C-18 Kieselgelsäule verfolgt und ist nach 15 Stunden bei Raumtemperatur beendet. Das Reaktionsgemisch wird mit Wasser verdünnt und auf einer C-18 Kieselgelsäule mittels eines Gradienten von Acetonitril in 2 % H₃PO₄ / Wasser chromatographiert. Die die reine Verbindungen enthaltenden Fraktionen werden gesammelt, durch ein Anionenaustauscherharz (Acetatform) filtriert und unter Erhaltung der Titelverbindung als Polyacetat, Polyhydrat lyophilisiert.

40

$$[\alpha]_D^{20} = -5,7^\circ \text{ (c = 0,317 in 95 % AcOH)}$$

50 MS (Ionenspray): 4626

Vergleichsbeispiel 4: N^α-Methyl [Ala¹]PTH-(1-38)-OH

Die Peptidkette wird auf dieselbe Weise zusammengesetzt, wie in Vergleichsbeispiel 3a. An der Position 1 wird anstatt Fmoc-Ser(tBu)-OH die unnatürliche Aminosäure Fmoc-N^α-Methyl-Ala-

OH an das Peptidharz gekuppelt. Abspaltung, Abspalten von Schutzgruppen und Reinigung werden wie in Vergleichsbeispiel 3a durchgeführt.

MS (Ionenspray) = 4455,91

5 Vergleichsbeispiel 5: [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Phe²³, His²⁵, His²⁶, Leu²⁷,
Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH

10 Diese Peptid wird in Analogie mit dem Verfahren von Vergleichsbeispiel 3a hergestellt. Anstatt zu 4-Hydroxymethylphenoxy-methylco(polystyrol-divinylbenzol) verestertes Fmoc-Gly wird die geeignete Fmoc Aminosäure, beispielsweise Fmoc-Ala, Fmoc-Phe, Fmoc-D-Ala, Fmoc-D-Phe usw. verwendet. Zusätzlich werden die funktionellen Gruppen der Seitenketten folgendermaßen geschützt: Thr(t-Butyl), Trp(Boc) und Tyr(t-Butyl).

15 Durch Wiederholen des in den Vergleichsbeispielen 3 und 5 beschriebenen Verfahrens aber unter Verwendung der geeigneten Ausgangsmaterialien können die folgenden Verbindungen erhalten werden.

Beispiel 1: [Leu⁸, Asp¹⁰, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³]hPTH(1-34)OH

Beispiel 2: [Leu⁸, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH

Beispiel 3: [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4007)

Beispiel 4: [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3906)

20 Beispiel 5: [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3965)

Beispiel 6: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH

Vergleichsbeispiel 7: [Leu⁸, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH

Beispiel 8: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4022)

25 Vergleichsbeispiel 9: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4077)

Beispiel 10: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4181)

Beispiel 11: [Leu⁸, Ala¹⁶, Asp¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4193)

Beispiel 12: [Leu⁸, Ala¹⁶, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4149)

30 Beispiel 13: [Leu⁸, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH

Beispiel 14: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3980)

Beispiel 15: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4240)

Beispiel 16: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3923)

Beispiel 17: [Leu⁸, Asp¹⁰, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4225)

Beispiel 18: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3999)

35 Beispiel 19: [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4166)

Vergleichsbeispiel 20: [Leu³³]-hPTH-(1-38)-OH

Vergleichsbeispiel 6: [1 -Aminocyclopentan-1 -carbonsäure¹]hPTH-(1-36)NH₂

40 Das Peptid wird schrittweise an einem auf Polystyrol basierenden Harzträger zusammengefügt. Die Fmoc-Gruppe wird zum Schutz der alpha-Aminogruppen verwendet.

Die funktionellen Gruppen der Seitenketten werden als Arg(Pmc), Asn(Trt), Asp(OtBu), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc) und Tyr(tBu) geschützt. Andere Aminosäuren bleiben ungeschützt.

45 4-(2',4'-Dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl)-phenoxy-co(polystyrol-divinylbenzol), 0,4 mmol/g, das beispielsweise wie in Tetrah. Letters, 28, 3787-3790 (1987) beschrieben hergestellt werden kann, wird dem folgenden Behandlungszyklus der Schritte (1) bis (5) unterzogen:

(1) DMF

50 (2) Piperidin (20 %) in DMF

(3) DMF

(4) Mischung von HOEt, Diisopropylcarbodiimid und Fmoc-Alanin (jeweils 0,8 mmol pro Gramm Ausgangsharz)

(5) DMF

55

Die Volumina der Waschschrifte und Reagenzien reichen von 5 bis 20 ml pro Gramm Ausgangsharz.

Im nächsten Behandlungszyklus (1) bis (5) wird Fmoc-Alanin durch Fmoc-Valin und so weiter bei jedem Zyklus ersetzt, um am Harz die korrekte Aminosäuresequenz der Titelverbindung zusammenzufügen.

Jeder Schritt wird so oft wie nötig wiederholt, um entweder die Reaktion des Harzes zu vervollständigen (Schritte 2, 4) oder die Entfernung des vorherigen Reagenzien vom Harz (Schritte 3, 5) zu vervollständigen. Harzproben werden nach jedem Zyklus entnommen und auf Vollständigkeit der Kupplungsreaktion durch einen colorimetrischen Test auf verbleibende Aminogruppen mittels Ninyhydrin getestet.

Am Ende der Synthese wird ein letzter Zyklus durchgeführt, der nur die Schritte (1) bis (3) enthält, und das Peptidharz wird mit 2-Propanol gewaschen, dann mit einem Gemisch von Methanol und Methylenechlorid (1:1 V/V) gewaschen und sorgfältig in einem Vakuumexsikkator getrocknet.

Das Peptidharz (1 g) wird in einem Gemisch (20 ml) aus Trifluoressigsäure, Wasser und 1,2-Ethandithiol (90:5:5 V/V) für 2 Stunden bei Raumtemperatur suspendiert, die Harzpartikel werden abfiltriert und mit einem kleinen Volumen TFA gewaschen. Das Produkt wird aus den vereinigten Filtraten durch die Zugabe von Ether (20 Volumina) ausgefällt, filtriert, mit mehr Ether gewaschen und getrocknet. Der Rest wird in 2 % Essigsäure gelöst, und die Lösung wird bei RT für 8 Stunden vor der Lyophilisierung stehengelassen. Das Lyophilisat wird auf einer C-18 Kieselgelsäule mittels eines Gradienten aus Acetonitril in 2 % H₃PO₄ chromatographiert. Die Fraktionen werden durch analytische HPLC überprüft, und die, die die reine Verbindung enthalten, werden gesammelt, durch ein Anionenaustauscherharz in der Acetatform filtriert und unter Erhaltung der Titelverbindung als Polyacetat, Polyhydrazid lyophilisiert.

Fmoc-1-aminocyclopentan-1-carbonsäure, die zur Herstellung des Peptidharzzwischenprodukts verwendet wird, kann hergestellt werden, wie dies beispielsweise durch G. Valle et al., 1988, in Can. J. Chem. 66:2575-2582 beschrieben worden ist.

MS (Ionenspray): 4312

Durch Wiederholung des im Vergleichsbeispiel 6 beschriebenen Verfahrens, aber unter Verwendung der geeigneten Ausgangsmaterialien, können folgende Verbindungen erhalten werden:

Vergleichsbeispiel 21: [Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)NH₂

Beispiel 22: [Gln¹⁸]hPTH(1-36)NH₂

Vergleichsbeispiel 23: [Ala³⁴]-hPTH(1-36)NH₂ (IS-MS: 4210)

Vergleichsbeispiel 24: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)NH₂

Die Verbindungen der (Vergleichs-)Beispiele 1 bis 24 zeigen korrekte Aminosäureverhältnisse in quantitativer Aminosäureanalyse.

In den folgenden Beispielen, die das rekombinante Verfahren der Erfindung beschreiben, werden, falls nichts anderes angegeben ist, die in Ausubel et al., 1991, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York beschriebenen Standardverfahren verwendet. Die in diesem Verfahren erhaltenen Fusionsproteine (1-38)PTH sind von dieser Erfindung nicht umfaßt.

Vergleichsbeispiel 25: Klonierung des Bakteriophagen T4 Gen 55

Zwei DNA Fragmente, eines, das die gesamte kodierende Sequenz des Bakteriophagen T4 Gen 55 enthält, und das andere Fragment, das nur einen Teil davon kodiert, werden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mittels gereinigter T4 DNA als Template amplifiziert. Oligonukleotide, die NdeI oder BamHI Restriktionsschnittstellen enthalten, werden als Primer verwendet. Die PCR Reaktionen (25 Zyklen, jeweils 30s 94°C, 30s 50°C, 30s 72°C) werden mit 1 ng Template und 100 pM des stromaufwärts liegenden Primers (GAGGTGCATA TGTCAGAAC TAAGCCT 27, wobei die NdeI Restriktionsschnittstelle von 7-12 Nukleotiden hiervon geliefert wird), und 100 pM des stromabwärts liegenden Primers (GGTCGGATCC ATCGTTAGCG TTAGCCTCAT ATAAAAAAATC 40, wobei die BamHI Restriktionsschnittstelle von 5-10 Nukleotiden hiervon geliefert wird), in 100 µl Reaktionspuffer durchgeführt, der 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 0,1 % Triton X 100 pH 9,0 enthält. Man erhält ein 0,6 kb Fragment.

Die verkürzte Form des Gen 55 wird durch PCR hergestellt, wie dies für das gesamte Gen beschrieben ist, mit dem Unterschied, daß man ein anderes Oligonukleotid als stromabwärts liegen-

den Primer verwendet (GGTCGGATCC TACGTTGGAC GAATGCAT 28, wobei die BamHI Schnittstelle durch die Nukleotide 5-10 hiervon geliefert wird). Man erhält ein 0,35 kb Fragment.

Die 0,6 kb und 0,35 kb DNA Fragmente werden mit den Restriktionsendonukleasen NdeI/BamHI verdaut und in den NdeI/BamHI verdauten Expressionsvektor pET17B (erhalten von Novagen) kloniert. Das 0,6 kb DNA Fragment kodiert das gesamte gp55 Protein (188 Aminosäurereste - siehe SEQ ID Nr. 1), während das 0,35 kb Fragment ein aminoterminales 12 kD Fragment von gp55 kodiert (112 Aminosäurereste - siehe SEQ ID Nr. 3).

Vergleichsbeispiel 26: Herstellung und Klonierung der DNA, die PTH(1-38) kodiert

Durch PCR werden DNA Fragmente erzeugt, die a) das den Aminosäureresten 110-115 der SEQ ID Nr. 1 und hPTH(1-38) entsprechende Linkerpeptid oder b) das den Aminosäureresten 186-191 der SEQ ID Nr. 3 und hPTH(1-38) entsprechende Linkerpeptid kodieren, indem man eine klonierte synthetische für PTH(1-38) kodierende Sequenz als Template verwendet. Die den Linker a) (GAGTGGATCC ATCGATCCAC CATCCGTATC AGAAATACAA CT 42) oder den Linker b) (GAGTGGATCC GTTAACGGTC CATCCGTATC AGAAATACAA CT 42) kodierenden Oligonukleotide werden als stromaufwärts liegende Primer verwendet. Der stromabwärts liegende Primer ist als (TCTACTCGAG TTAACCCAGA GCTACAAAAT TATG 34) gezeigt. Die stromaufwärts liegenden Primer enthalten jeweils eine BamHI Klonierungsstelle und die stromabwärts liegenden Primer enthalten eine Xhol Schnittstelle (Nukleotide 5-10 jeder Sequenz). Die PCR Reaktion wird unter denselben Bedingungen durchgeführt, wie sie in Vergleichsbeispiel 25 beschrieben sind.

Nach der Spaltung mit BamHI und Xhol werden die 0,23 kb PCR Produkte in die BamHI-Xhol Verdaus der gp55-pET17B Plasmide inseriert, welche in Vergleichsbeispiel 25 erhalten wurden.

Zur Expression der Fusionsproteine werden die entstehenden Plasmidkonstrukte in E. coli BL21 (DE3) Lys E transformiert, und ferner werden bakterielle Einzelkolonien erzeugt. Die Expression der Fusionsproteine wird durch Inkubation einer Vorkultur bei 37°C auf einem Rundschüttler über Nacht in "Circle" Wachstumsmedium (Bio 101) erhalten. Eine Hauptkultur wird mit 1 bis 5 % des Hauptkulturvolumens mit der Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wird dann bei einer Temperatur von 37°C und einem pH von 6,9 bis 7,1 fermentiert, während sie mit 10 l/min belüftet wird und bei 200-400 U/min geschüttelt wird. Die Expression wird durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert, sobald die Kultur eine OD₅₅₀ von etwa 1,0 bis 5,0 erreicht hat. Nach der Induktion wird die Fermentation für fünf Stunden fortgesetzt, und dann wird die Fermentationsbrühe ohne Abtötung der E. coli Zellen geerntet. Die geernteten Zellen werden mit einer Rohrzentrifuge zentrifugiert, in Probenpuffer resuspendiert und auf Expression durch SDS PAGE getestet. Das Zellpellet wird dann bis zur Reinigung eingefroren. Die verwendeten Verfahren und die Wirtszellen sind vollständig in Studier et al, 1990, "Use of T7 RNA Polymerase to direct Expression of Cloned Genes", Methods in Enzymology, Academic Press, Seiten 60 bis 89 beschrieben.

Vergleichsbeispiel 27: Herstellung von Einschlußkörpern

Eingefrorene E. coli Pellets, die von Vergleichsbeispiel 26 erhalten wurden, werden 25 %ig G/V in Puffer A (50 mM Tris pH 8,0, das 2 mM DTT, 5 mM Benzamidin-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,0 mM MnCl₂, 10 µg/ml DNase 1 und 2 mg/ml Lysozym enthält) resuspendiert und durch Röhren für 1 Stunde bei Raumtemperatur gemischt. Die resuspendierten Zellen werden lysiert, indem man sie durch einen Manton-Gaulin Homogenisator (2 Durchläufe bei 1200 bar) durchlaufen lässt und das entstehende Lysat auf Eis hält. Das Lysat wird zweifach mit eiskaltem Puffer B (50 mM Tris pH 8,0, das 2 mM DTT, 5 mM Benzamidin-HCl und 4 mM EDTA enthält) verdünnt und für 30 min bei 27 500 g zentrifugiert.

Der Überstand auf der Zentrifuge wird sorgfältig abgehoben und verworfen. Das Pellet wird in Puffer B 25 %ig G/V resuspendiert, einmal mehr durch den Manton-Gaulin durchgelassen und wie vorher zentrifugiert. Dieses Verfahren wird einmal unter Verwendung von Puffer B und einmal mit Wasser wiederholt. Die entstehenden Einschlußkörperpellets werden gewogen und bei -20° C eingefroren, bis sie benötigt werden.

Vergleichsbeispiel 28: Auflösung und Spaltung der gp55-Asp-Pro-Pro-(1-38)hPTH-OH Einschlußkörper

Eingefrorene gp55-Asp-Pro-Pro-(1-38)hPTH enthaltende Einschlußkörper, wie sie in Vergleichsbeispiel 27 erhalten wurden, werden in 10 mM HCl Säurelösung (analytischer Reinheitsgrad) in einer Endkonzentration von 6 % G/V suspendiert. Die Lösung wird für 24 Stunden bei 50°C inkubiert und die Reaktion wird durch die Zugabe von 1 Volumen wässriger 100 mM NaOAc Lösung beendet. Der verdünnte Überstand wird durch Zentrifugation bei 27 500 g für 30 Minuten geklärt und durch einen Glasfiberfilter filtriert.

Vergleichsbeispiel 29: Auflösung und Spaltung von gp55-Asn-Gly-Pro-(1-38)hPTH Einschlußkörpern

Eingefrorene gp55-Asn-Gly-Pro-(1-38)PTH enthaltende Einschlußkörper, die aus Vergleichsbeispiel 27 erhalten wurden, werden in 6 M Guanidin-HCl (das 2 M Hydroxylamin-HCl enthält und auf pH 9,0 durch Zugabe von 4,5 M LiOH gebracht wurde) unter Bildung von abgeschätzten 5 mg/ml Protein gelöst. Der pH wird erneut auf pH 9 durch weitere Zugabe von LiOH eingestellt und die Lösung wird für 4 Stunden bei 45°C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Ameisensäure auf pH4 beendet und die Lösung wird wie in Vergleichsbeispiel 28 beschrieben zentrifugiert und filtriert.

Vergleichsbeispiel 30: Präparative HPLC von Gly-Pro und Pro-Pro (1-38)hPTH

Filtrierte Überstände aus der Spaltung werden auf einer analytischen Umkehrphasen HPLC (Orpogen HD-Gel-RP-7s-300, 4 x 150 mm Säule) analysiert und mit einem bekannten (1-38)PTH Standard (Bachem) verglichen, um die PTH Konzentration zu bestimmen. Die Säule wird mit 85 % HPLC Puffer A (90 % Wasser, 10 % Acetonitril, worin 0,1 % V/V TFA enthalten sind) und 15 % HPLC Puffer B (10 % Wasser, 90 % Acetonitril, worin 0,1 % TFA enthalten sind) äquilibriert und mit einem Gradienten von 15 % HPLC Puffer B bis 100 % HPLC Puffer B über 15 Minuten bei einer Flußrate von 0,75 ml/min eluiert.

In Abhängigkeit von der Größe der Präparation werden die Überstände entweder auf eine 1,0 x 25 cm C4 Vydac oder eine 2,2 x 25 cm C4 Vydac aufgetragen. Die Säulen werden mit 85 % HPLC Puffer A und 15 % HPLC Puffer B bei Flußraten von jeweils 4 ml/min und 10 ml/min äquilibriert. Die Säulen werden mit Gradienten von jeweils 15 % B bis 85 % B über 80 ml und 15 % B bis 55 % B über 300 ml eluiert.

Die Gly-Pro-hPTH(1-38) oder Pro-Pro-hPTH(1-38) Peaks werden per Hand gesammelt und das Acetonitril wird später unter Vakuum entfernt. Die analytische HPLC wird verwendet, um sowohl die Peptidkonzentration nach der Spaltung als auch in den gesammelten Fraktionen zu bestimmen.

Die Lösemittel-freien Peptidlösungen werden mit einem gleichen Volumen 100 mM Natriumacetat verdünnt und der pH wird, falls erforderlich, auf pH 5,4 eingestellt. Nach der Filtration (0,2 µm) wird die Lösung auf eine Kationenaustauschersäule (entweder Mono S oder SP-Sepharose High Performance, die jeweils in HR10/10 oder XK16/10 Säulen gepackt sind) aufgetragen, die mit 50 mM Natriumacetat pH 5,4 (Puffer C) äquilibriert ist. Die Säule wird mit einem NaCl Gradienten von 0 bis 500 mM in Puffer C über 7,5 Säulenvolumina eluiert. 10 ml Fraktionen werden gesammelt und der X-X-(1-38)hPTH Peak wird vereinigt. Die Peptidkonzentration wird vor der Verwendung der HPLC bestimmt.

Diese Säule dient sowohl dem Wechsel der Peptide in einen physiologischeren Puffer als auch der Entfernung der zusätzlichen Peptide, die durch die chemische Spaltung des Fusionsproteins an sich gebildet wurden.

Vergleichsbeispiel 31: Enzymatische Entfernung von X-X aus X-X-(1-38)hPTH-OH

Vereinigte Peptidfraktionen, wie sie in Vergleichsbeispiel 30 erhalten wurden (Konzentrationsbereich 1,5 - 2,0 mg/ml), werden auf pH 8,0 durch die Zugabe von festem Tris gebracht. Gereinigte

X-Prolyl Dipeptidase (0,5 mg/ml in PBS pH 7,2) (Nardi et al. (1991) App. Env. Microbiol. 57, Nr. 1, 45-50) wird 1 : 1000 zugegeben und die Lösung wird für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von TFA bis 0,2 % (pH = 5,0) gestoppt und das entstehende (1-38)PTH wird mittels HPLC (unter Verwendung derselben Bedingungen wie in Vergleichsbeispiel 30 beschrieben) isoliert. Das Lösemittel wird entfernt und das Produkt wird nach der Entfernung von Aliquots für die N-terminale Sequenz- und Massenspektroskopieanalyse lyophilisiert.

Beispiele für Ausbeuten, wie sie mittels der zwei oben beschriebenen Fusionsproteinansätze erhalten werden, sind folgende:

Gen55-Asp-Pro-Pro-(1-38)PTH (mittels der "verkürzten" Form des Gen55)
Unter teilweise optimierten Fermentationsbedingungen wird ein Zellpellet mit 215 g Naßgewicht aus einer 10 Liter Fermentation erhalten. Der prozentuale Anteil der Expression des Fusionsprodukts liegt bei etwa 37 %. Aus diesem Pellet werden 31 g Einschlußkörper isoliert. Die Proteinreinheit (in Bezug auf das Fusionsprotein) dieser Körper beträgt 61 %. Nach der Auflösung, Spaltung und Zentrifugation/Filtration werden etwa 620 mg Pro-Pro-PTH detektiert. Dieses Material ergibt 580 mg Pro-Pro-PTH nach der anschließenden C4-Vydac HPLC. Nach Verdünnung Kationenaustausch auf Mono S, Verdau mit X-Prolyldipeptidylpeptidase (bei einer Pro-Pro-PTH Konzentration von 2 mg/ml), HPLC und Lyophilisierung, werden 440 mg des lyophilisierten reinen Produkts mit voller biologischer Aktivität erhalten. Dies stellt eine Ausbeute von 71 % zwischen dem abgestoppten Spaltungsschritt und dem Endprodukt dar.

Gen55-Asn-Gly-Pro-(1-38)PTH (mittels der "langen" Form des Gen55)
Aus einer nicht-optimierten 20 Liter Fermentation wird ein Zellpellet mit 78 g Naßgewicht mit 50 %iger Expression des Fusionsproteins geerntet. Nach der Lyse und Zentrifugation werden 18 g an "90 % reinen" Einschlußkörpern erhalten. Anschließend an den sauren Stoppschritt und die Zentrifugation/Filtration werden etwa 470 mg Gly-Pro PTH detektiert. Nach einer HPLC auf C4 Vydac werden etwa 355 mg des Peptids detektiert, die sich auf 321 mg nach dem SP-Sepharose Kationenaustausch reduzieren. Die enzymatische Entfernung der Gly und Pro Reste wird bei 2 mg/ml ausgeführt. Nach dem letzten HPLC Schritt und der Lyophilisierung werden 244 mg reines voll biologisch aktives hPTH(1-38)OH gewonnen, was eine Ausbeute von 52 % vom Reaktionsschritt der abgestoppten Spaltung aus darstellt.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen in freier Form oder in Form von pharmazeutisch annehmbaren Salzen und Komplexen zeigen wertvolle pharmakologische Eigenschaften, wie sie in Tierversuchen deutlich wurden und sind daher in der Therapie indiziert.

Die biologische Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen wird *in vitro* durch die Messung ihrer Fähigkeit zur Stimulierung der cyclischen AMP Synthese in Ratten UMR 106-06 und humangen SaOS-2 Osteosarcomzellen gemäß dem Verfahren von Marcus und Aurbach in Endocrinology, 85, 801-810 (1969) ermittelt. Ratten UMR 106 Osteosarcomzellen werden in Eagle's Minimum Essential Medium - 10 % FCS in 12 Loch Platten bis zum Zellrasen gezogen, und humane SaOS-2 Osteosarcomzellen werden in McCoy's 5A Medium - 10 % FCS gezogen. Das Medium wird dann durch ein Medium mit 2 % FCS ersetzt und 1-5 µCi/Probenloch [3H]-Adenin wird zugegeben. Zwei Stunden später werden die Zellen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und in DMEM - 1 % RSA inkubiert, das 1 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin enthielt, um Wirkungen aufgrund von Phosphodiesterasen auszuschließen. 20 Minuten später werden die Testsubstanzen zugegeben. Die Reaktion wird gestoppt und das cAMP 15 Minuten durch Zugabe von eiskalter 5 %iger Trichloressigsäure extrahiert. Eine Trägerlösung (0,5 ml/Probenloch) wird zugegeben, die 5 mM unmarkiertes Adenin, Adenosin, AMP, ADP, ATP und cAMP wie auch 0,4 µCi [14C]-Adenosin zur Bestimmung der Ausbeute enthält. [3H]-cAMP wird mittels in Serie geschalteter Dowex 50W-X4 (200-400 Mesh) und Aluminiumoxid Chromatographie abgetrennt und ausgezählt. Die Ergebnisse werden in % der Lösemittelkontrolle und der aus DRC Kurven bestimmten EC₅₀ Werte errechnet. Die erfindungsgemäßen Verbindungen stimulieren die cAMP Bildung in Ratten UMR 106-06 und humanen SaOS-2 Osteosarcomzellen bei einer Konzentration von 10⁻¹¹ bis 10⁻⁶ M.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen auch Bindungsaffinität an PTH Rezeptoren auf, wie es sich aus folgendem Versuch ergibt:

[Tyr³⁶]PTHrP(1-36)amid aus dem Huhn wird mit einer spezifischen Aktivität von 2200 Ci/mmol durch das Lactoperoxidaseverfahren (Anawa Lab. AG, Wangen) iodierte. Einschichtige Zellagen von Opossumnierenzellen werden mit 200 µl DMEM und HAM's F12 (1:1) gewaschen, worin 1 % RSA enthalten sind, und bei 16°C mit 50 000 cpm an [¹²⁵I-Tyr³⁶]chPTHrP(1-36)amid pro Probenloch in Gegenwart oder Abwesenheit von 1 µM [Tyr³⁶]chPTHrP(1-36)amid inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen mit 0,5 ml Medium (4°C) gewaschen, mit 0,5 ml 1 N NaOH lysiert und die Radioaktivität wird bestimmt. Die spezifische Bindung wird als Gesamtbindung abzüglich der unspezifischen Bindung definiert. Die Kompetitionskurven werden durch SCTFIT, einem Computerprogramm mit nicht-linearer Regression analysiert (Feyen et al, 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun. 187:8-13) und die Daten werden als mittlere pK_D Werte (n=2 bis 3) dargestellt. Die erfindungsgemäßen Verbindungen zeigen in diesem Test eine als mittlerer pK_D Wert ausgedrückte Bindungsaffinität von 7 bis 10.

Ferner erhöhen die erfindungsgemäßen Verbindungen Plasmacalciumspiegel nach kontinuierlicher s.c. Infusion, wie dies beispielsweise in männlichen tyreoparathyreidektomierten Wistar Ratten bestimmt wurde, die 140 bis 170 g wogen. 5 Tage nach der Tyreoparathyreidektomie implantiert man den Ratten im Genick Alzet-Minipumpen und infundiert die Testverbindungen in Mengen von 0,3 bis 30 µg/Tag/Ratte. Durch retroorbitale Punktion am Morgen der Tage 1, 2, 3 und 6 wird hierach Blut entnommen und die Plasmacalciumkonzentrationen werden photometrisch bestimmt. In diesem Test erhöhen die erfindungsgemäßen Verbindungen das Plasmacalcium.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind demnach zur Verhinderung oder zur Behandlung von allen Knochenzuständen indiziert, die mit erhöhtem Calciumverlust oder erhöhte Calciumresorption zusammenhängen, oder bei denen eine Calciumfixierung in den Knochen wünschenswert ist, beispielsweise unterschiedlich entstandene Osteoporose (beispielsweise juvenil, menopausal, post-menopausal, post-traumatisch, durch hohes Alter oder Corticosteroidtherapie oder Inaktivität verursacht), Frakturen, Osteopathie, einschließlich akuten und chronischen Zuständen, die mit Skelettdemineralisierung zusammenhängen, Osteomalacie, periodontaler Knochenverlust oder Knochenverlust durch Arthritis oder Osteoarthritis oder zur Behandlung von Hypoparathyreoidismus.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind insbesondere für die Prävention oder Behandlung von unterschiedlich entstandener Osteoporose indiziert.

Für alle obigen Verwendungen liegt eine indizierte tägliche Dosierung im Bereich von etwa 0,003 bis etwa 10 mg, vorzugsweise 0,003 bis 3, noch bevorzugter 0,01 bis 1 mg einer erfindungsgemäßen Verbindung. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können einmal am Tag oder bis zu zweimal pro Woche verabreicht werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in freier Form oder in pharmazeutisch annehmbarer Salzform oder als Komplexe verabreicht werden. Solche Salze und Komplexe können auf herkömmliche Weise hergestellt werden und entsprechen größtenordnungsmäßig der Wirkung der freien Verbindungen. Die vorliegende Erfindung liefert auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine erfindungsgemäße PTH-Verbindung in freier Form oder in einer pharmazeutisch annehmbaren Salzform oder Komplexform zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel oder Träger hierfür enthält. Solche Zusammensetzungen können auf herkömmliche Weise formuliert werden. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können durch jeden herkömmlichen Weg verabreicht werden, parenteral, beispielsweise in Form von injizierbaren Lösungen oder Suspensionen, enteral, beispielsweise oral, wie in Form von Tabletten oder Kapseln, oder transdermal, nasal oder in Zäpfchenform.

Gemäß dem Vorangegangen liefern die vorliegende Erfindung ferner:

- a) eine erfindungsgemäße Verbindung oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz oder Komplex hiervon zur Verwendung als Pharmazeutikum,
- b) eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verbesserung der Knochenbildung, beispielsweise Prävention oder Behandlung von allen Knochenzuständen, die mit erhöhtem Calciumverlust oder erhöhte Calciumresorption zusammenhängen oder bei denen eine Calciumfixierung in den Knochen wünschenswert ist, beispielsweise bei unterschiedlich entstandener Osteoporose (beispielsweise juvenil, menopausal, post-menopausal, post-traumatisch, durch hohes Alter oder Corticosteroidtherapie oder Inaktivität verursacht), Frakturen, Osteopathie, einschließlich akuten und chronischen Zuständen, die mit Skelettdemineralisierung zusammenhängen, Osteomalacie perio-

dontalem Knochenverlust oder Knochenverlust durch Arthritis oder Osteoarthritis, oder zur Behandlung eines Hypoparathyreoidioms bei einem behandlungsbedürftigen Patienten.

c) eine erfindungsgemäße Verbindung in freier Form oder in einer pharmazeutisch annehmbaren Salzform oder Komplexform zur Verwendung für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Verbesserung der Knochenbildung, z.B. die bei den unter b) genannten Zuständen verwendet werden kann.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Verbindungen als Zusatz oder Adjuvans bei einer anderen Therapie verwendet werden, beispielsweise einer Therapie, die einen Knochenresorptionshemmstoff verwendet, wie beispielsweise in der Osteoporosetherapie, insbesondere einer Therapie, die Calcium, Calcitonin oder ein Analogon oder Derivat hiervon verwendet, beispielsweise Lachs-, Aal- oder humanes Calcitonin, ein Steroidhormon, beispielsweise ein Östrogen, ein partieller Östrogenagonist oder eine Östrogen-Gestagen Kombination, ein Biphosphonat, Vitamin D oder ein Analogon hiervon, oder jede Kombination hiervon.

Wenn die erfindungsgemäßen Verbindungen in Kombination verabreicht werden, beispielsweise als Adjuvans bei der Therapie der Knochenresorptionshemmung, werden die Dosierungen für den mitverabreichten Hemmstoff natürlich variieren in Abhängigkeit vom verwendeten Hemmstoffmittel, beispielsweise ob es ein Steroid oder Calcitonin ist, vom zu behandelnden Zustand, ob es eine heilende oder präventive Therapie ist, vom Verabreichungsplan und so weiter.

Gemäß dem Vorangegangenen liefert die vorliegende Erfindung in einem weiteren Aspekt:

d) eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verbesserung der Knochenbildung, beispielsweise Prävention oder Behandlung des Calciumverlustes, wie aller zur Prävention oder Behandlung der vorher angeführten spezifischen Zustände oder Krankheiten, bei einem behandlungsbedürftigen Patienten, gekennzeichnet durch a) eine erfindungsgemäße Verbindung und b) einer zweiten Arzneimittelsubstanz, wobei diese zweite Arzneimittelsubstanz ein Knochenresorptionshemmstoff ist, wie er beispielsweise oben erwähnt wurde.

Die Verbindungen der Beispiele 3, 5, 8, 14 und 15 sind bevorzugt.

SEQUENZE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: SANDOZ LTD
- (B) STREET: PO BOX
- (C) CITY: BASEL
- (D) STATE: BS
- (E) COUNTRY: SWITZERLAND
- (F) POSTAL CODE (ZIP): CH 4002
- (G) TELEPHONE: 061 324 1111
- (H) TELEFAX: 061 322 7572
- (I) TELEX: 965 050 55

(ii) TITLE OF INVENTION: Organic Compounds

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 12

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

AT 408 100 B

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 717 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

- 5 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

- 10 (iii) HYPOTHETICAL: NO

- (iv) ANTI-SENSE: NO

- 15 (v) FRAGMENT TYPE: internal

- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Bacteriophage T4/Homo sapiens

- 20 (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: CDS
 - (B) LOCATION: 101..559

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

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

55

AT 408 100 B

TGT TTT AAT GCA TTC GTC CAA CGT GGA TCC ATC GAT CCA CCA TCC GTA	451
Cys Phe Asn Ala Phe Val Gln Arg Gly Ser Ile Asp Pro Pro Ser Val	
105 110 115	
5 TCA GAA ATA CAA CTA ATG CAT AAT CTG GGT AAA CAT CTG AAT TCA ATG	499
Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met	
120 125 130	
10 GAA CGT GTA GAA TGG CTG CGT AAA AAA CTG CAG GAT GTA CAT AAT TTT	547
Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe	
135 140 145	
15 GTA GCT CTG GGT TAACTCGAGC AGATCCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAGGA	599
Val Ala Leu Gly	
150	
20 AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA CCGCTGAGCA ATAACTAGCA TAACCCCTTG	659
GGGCCCTTGG	
20 GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTT GCTGAAAGGA GGAACTATAT	717
CCGGATAA	

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:	
	(A) LENGTH: 153 amino acids
	(B) TYPE: amino acid
	(D) TOPOLOGY: linear
30 (ii) MOLECULE TYPE: protein	
	(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:
35 Met 1 Ser Glu Thr Lys 5 Pro Lys Tyr Asn Tyr 10 Val Asn Asn Lys Glu 15 Leu	
Leu Gln Ala Ile Ile Asp Trp Lys Thr 25 Glu Leu Ala Asn Asn Lys Asp	
40 Pro Asn Lys 35 Val Val Arg Gln Asn 40 Asp Thr Ile Gly Leu Ala Ile Met	
Leu Ile Ala Glu Gly Leu Ser 55 Lys Arg Phe Asn Phe 60 Ser Gly Tyr Thr	
45 Gln 65 Ser Trp Lys Gln Glu 70 Met Ile Ala Asp Gly 75 Ile Glu Ala Ser Ile 80	
50 Lys Gly Leu His Asn 85 Phe Asp Glu Thr Lys 90 Tyr Lys Asn Pro His 95 Ala	
Tyr Ile Thr Gln Ala Cys Phe Asn Ala 105 Phe Val Gln Arg Gly 110 Ser Ile	

55

AT 408 100 B

Asp	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn	Leu	Gly	Lys	
		115					120					125				
5	His	Leu	Asn	Ser	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Gln
		130				135					140					
10	Asp	Val	His	Asn	Phe	Val	Ala	Leu	Gly							
		145				150										

10 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 945 base pairs
 - (B) TYPE: nucleic acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: linear

- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

- 20 (iii) HYPOTHETICAL: NO

- (iv) ANTI-SENSE: NO

- 25 (v) FRAGMENT TYPE: internal

- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Bacteriophage T4/Homo sapiens
- (ix) FEATURE:
 - (A) NAME/KEY: CDS
 - (B) LOCATION: 101..787

- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

35	AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCACAAC GGTTTCCCTC	60
40	TAGAAATAAT TTTGTTTAAC TTTAAGAAGG AGATATACAT ATG TCA GAA ACT AAG Met Ser Glu Thr Lys 1 5	115
45	CCT AAA TAT AAT TAC GTA AAC AAT AAA GAG CTT TTA CAA GCT ATT ATT Pro Lys Tyr Asn Tyr Val Asn Asn Lys Glu Leu Leu Gln Ala Ile Ile 10 15 20	163
50	GAT TGG AAA ACA GAA TTA GCA AAT AAT AAA GAC CCA AAT AAA GTA GTT Asp Trp Lys Thr Glu Leu Ala Asn Asn Lys Asp Pro Asn Lys Val Val 25 30 35	211
55	CGT CAG AAT GAT ACT ATC GGA TTA GCC ATT ATG CTT ATT GCA GAA GGC Arg Gln Asn Asp Thr Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Ile Ala Glu Gly 40 45 50	259

AT 408 100 B

	TTA TCT AAA CGT TTC AAC TTT TCA GGA TAC ACC CAG TCT TGG AAA CAA Leu Ser Lys Arg Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Thr Gln Ser Trp Lys Gln 55 60 65	307
5	GAA ATG ATT GCA GAT GGT ATA GAA GCT TCT ATT AAG GGG CTT CAC AAT Glu Met Ile Ala Asp Gly Ile Glu Ala Ser Ile Lys Gly Leu His Asn 70 75 80 85	355
10	TTT GAT GAA ACG AAA TAT AAA AAC CCA CAT GCG TAT ATA ACT CAA GCT Phe Asp Glu Thr Lys Tyr Lys Asn Pro His Ala Tyr Ile Thr Gln Ala 90 95 100	403
15	TGT TTT AAT GCA TTC GTC CAA CGT ATT AAA AAA GAA CGT AAG GAA GTT Cys Phe Asn Ala Phe Val Gln Arg Ile Lys Lys Glu Arg Lys Glu Val 105 110 115	451
20	GCA AAG AAA TAT AGT TAC TTC GTT CAC AAT GTC TAT GAC AGC CGT GAC Ala Lys Lys Tyr Ser Tyr Phe Val His Asn Val Tyr Asp Ser Arg Asp 120 125 130	499
25	GAC GAT ATG GTT GCG TTA GTA GAT GAA ACT TTT ATT CAA GAC ATC TAT Asp Asp Met Val Ala Leu Val Asp Glu Thr Phe Ile Gln Asp Ile Tyr 135 140 145	547
30	GAT AAA ATG ACG CAT TAC GAA GAA TCA ACC TAT AGA ACA CCG GGG GCT Asp Lys Met Thr His Tyr Glu Glu Ser Thr Tyr Arg Thr Pro Gly Ala 150 155 160 165	595
35	GAA AAG AAA AGT GTT GTA GAT GAT TCT CCT AGT TTG GAT TTT TTA TAT Glu Lys Lys Ser Val Val Asp Asp Ser Pro Ser Leu Asp Phe Leu Tyr 170 175 180	643
40	GAG GCT AAC GAT GGA TCC GTT AAC GGT CCA TCC GTA TCA GAA ATA CAA Glu Ala Asn Asp Gly Ser Val Asn Gly Pro Ser Val Ser Glu Ile Gln 185 190 195	691
45	CTA ATG CAT AAT CTG GGT AAA CAT CTG AAT TCA ATG GAA CGT GTA GAA Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met Glu Arg Val Glu 200 205 210	739
50	TGG CTG CGT AAA AAA CTG CAG GAT GTA CAT AAT TTT GTA GCT CTG GGT Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe Val Ala Leu Gly 215 220 225	787
55	TAACTCGAGC AGATCCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAGGA AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA	847
	CCGCTGAGCA ATAACTAGCA TAACCCCTTG GGGCCCTTGG GCCCTCTAAA CGGGTCTTGA	907
	GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAACTATAT CCGGATAA	945

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

55 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

AT 408 100 B

- (A) LENGTH: 229 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (D) TOPOLOGY: linear

5 (ii) MOLECULE TYPE: protein

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

10	Met	Ser	Glu	Thr	Lys	Pro	Lys	Tyr	Asn	Tyr	Val	Asn	Asn	Lys	Glu	Leu
	1				5				10						15	
	Leu	Gln	Ala	Ile	Ile	Asp	Trp	Lys	Thr	Glu	Leu	Ala	Asn	Asn	Lys	Asp
				20					25					30		
15	Pro	Asn	Lys	Val	Val	Arg	Gln	Asn	Asp	Thr	Ile	Gly	Leu	Ala	Ile	Met
			35					40					45			
	Leu	Ile	Ala	Glu	Gly	Leu	Ser	Lys	Arg	Phe	Asn	Phe	Ser	Gly	Tyr	Thr
20		50				55				60						
	Gln	Ser	Trp	Lys	Gln	Glu	Met	Ile	Ala	Asp	Gly	Ile	Glu	Ala	Ser	Ile
	65					70				75			80			
25	Lys	Gly	Leu	His	Asn	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Tyr	Lys	Asn	Pro	His	Ala
				85					90				95			
	Tyr	Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Phe	Asn	Ala	Phe	Val	Gln	Arg	Ile	Lys	Lys
				100					105			110				
30	Glu	Arg	Lys	Glu	Val	Ala	Lys	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Val	His	Asn	Val
			115					120				125				
	Tyr	Asp	Ser	Arg	Asp	Asp	Asp	Asp	Met	Val	Ala	Leu	Val	Asp	Glu	Thr
	130					135						140				Phe
35	Ile	Gln	Asp	Ile	Tyr	Asp	Lys	Met	Thr	His	Tyr	Glu	Glu	Ser	Thr	Tyr
	145					150					155				160	
40	Arg	Thr	Pro	Gly	Ala	Glu	Lys	Lys	Ser	Val	Val	Asp	Asp	Ser	Pro	Ser
				165					170				175			
	Leu	Asp	Phe	Leu	Tyr	Glu	Ala	Asn	Asp	Gly	Ser	Val	Asn	Gly	Pro	Ser
				180					185				190			
45	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn	Leu	Gly	Lys	His	Leu	Asn	Ser
			195					200				205				
	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His	Asn
	210					215						220				
50	Phe	Val	Ala	Leu	Gly											
				225												

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 27 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
- 10 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

15 GAGGTGCATA TGTCAGAAC TAAGCCT

27

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

- 20 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 40 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
- 25 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

35 GGTGGGATCC ATCGTTAGCG TTAGCCTCAT ATAAAAAAATC

40

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- 40 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 28 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
- 45 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
(iii) HYPOTHETICAL: NO
(iv) ANTI-SENSE: NO
(v) FRAGMENT TYPE: internal
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

55

GGTCGGATCC TACGTTGGAC GAATGCAT

28

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 42 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

10 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

15 (iii) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

20 GAGTGGATCC ATCGATCCAC CATCCGTATC AGAAAATACAA CT

42

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

- 25 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 42 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

30 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

35 (iii) ANTI-SENSE: NO

(v) FRAGMENT TYPE: internal

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

40 GAGTGGATCC GTTAACGGTC CATCCGTATC AGAAAATACAA CT

42

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

- 45 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 34 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

50 (ii) MOLECULE TYPE: cDNA

(iii) HYPOTHETICAL: NO

55 (iii) ANTI-SENSE: NO

- (v) FRAGMENT TYPE: internal
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

5 TCTACTCGAG TTAACCCAGA GCTACAAAAT TATG

34

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 34 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Homo sapiens

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: 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	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His
				20					25					30		

30 Asn Phe

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 - (A) LENGTH: 36 amino acids
 - (B) TYPE: amino acid
 - (C) STRANDEDNESS: single
 - (D) TOPOLOGY: unknown
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
 - (A) ORGANISM: Homo sapiens
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

50	Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn	Leu	Gly	Lys	His	Leu	Asn
	1					5				10					15	

55

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
 20 25 30

Asn Phe Val Ala
 5 35

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 10 (A) LENGTH: 38 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: unknown

15 (ii) MOLECULE TYPE: protein

(iii) HYPOTHETICAL: NO

20 (iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:
 (A) ORGANISM: Homo sapiens

25 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:

25	Ser	Val	Ser	Glu	Ile	Gln	Leu	Met	His	Asn	Leu	Gly	Lys	His	Leu	Asn
	1				5					10					15	
30	Ser	Met	Glu	Arg	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Lys	Lys	Leu	Gln	Asp	Val	His
				20					25				30			
	Asn	Phe	Val	Ala	Leu	Gly										
				35												

35 PATENTANSPRÜCHE:

1. PTH Verbindung der Formel I

$$\text{Ser}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Leu}-R_1-\text{His}-R_2-R_3-\text{Gly}-R_4-\text{His}-\text{Leu}-R_5-R_6-R_7-R_8-\text{Arg}-\text{Val}-\text{Glu}-\text{Trp}-R_9-\text{Lys}-\text{Leu}-\text{Gln}-\text{Asp}-\text{Val}-\text{His}-R_{10}-R_{11}-(R_{12})_n-X$$
 worin
 - R₁ Met oder Leu ist;
 - R₂ Asn, Asp, Gly, Gln, Glu, His, Ser, Thr oder Tyr ist;
 - R₃ Leu oder Lys ist;
 - R₄ Lys oder D- oder L-Ala, -Cys, -Gln, -Ile, -Asn, -Trp, -Asp, -Val, -Thr, -Ser, -Tyr, -Met, -Leu oder Gly ist;
 - R₅ Asn, Gln, D-Gln oder D- oder L-Lys, -Ser, -Leu, -Ala oder -Gly ist;
 - R₆ Ser, Asp, Ala, Glu, Gln, Phe, His, Ile oder Lys ist;
 - R₇ Gln ist;
 - R₈ Glu, Arg, Ala, Val, Tyr, Ser, Lys, Met, His, Gly, Pro, Asn oder Ile ist;
 - R₉ Lys, Gln oder Arg ist;
 - R₁₀ Asn, Thr, D-Thr oder D- oder L-Ser, -Leu, -Gly, -Gln, -Arg, -Pro, -Asp, -Ile oder -Lys ist;
 - R₁₁ Phe oder Ala ist;
 - R₁₂ Val, Val-Ala, Val-Ala-Leu oder Val-Ala-Leu-Gly ist,
- 55 n 0 oder 1 ist; und

- X OH, OR_a, NH₂ oder NR_bR_c ist, worin R_a C₁₋₄alkyl ist, eines von R_b und R_c für Wasserstoff steht und das andere für einen C₁₋₆alkyl steht,
 vorausgesetzt, dass R₇ Gln oder Tyr ist und/ oder R₁₀ Thr ist und/oder R₁₁ Ala ist, die Verbindung zumindest einen Rest enthält, der aus einer L- oder D- α -Aminosäure, C₂₋₆Alkoxy carbonyl und substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist und der an die endständige Aminogruppe der PTH Verbindung gebunden ist,
 und/oder
 die Verbindung zumindest einen Rest enthält, der aus C₂₋₆Alkoxy carbonyl und substitutiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist und der an eine oder mehrere Seitenkettenaminogruppen der PTH Verbindung gebunden ist,
 in freier Form oder in Salzform oder in Komplexform.
2. PTH Verbindung nach Anspruch 1, worin R₁₀ Thr ist.
3. PTH Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, worin R₁₁ Ala ist.
4. PTH Verbindung die ausgewählt ist aus
 [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH;
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH;
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH;
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH;
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH;
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH;
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH;
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH; und
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH; wobei
 die Verbindung zumindest einen Rest enthält, der aus einer L- oder D- α -Aminosäure, C₂₋₆Alkoxy carbonyl und substituiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl ausgewählt ist und der an die endständige Aminogruppe der PTH Verbindung gebunden ist,
 und/oder
 die Verbindung zumindest einen Rest enthält, der aus C₂₋₆Alkoxy carbonyl und substitutiertem C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl, ausgewählt ist und der an eine oder mehrere Seitenkettenaminogruppen der PTH Verbindung gebunden ist,
 in freier Form oder in Salzform oder in Komplexform.
5. PTH Verbindung die ausgewählt ist aus
 [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH;
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH;
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH;
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH, und
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH,
 in freier Form oder in Salzform oder in Komplexform.
6. Verfahren zur Herstellung eines PTH Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, in dem ein Fusionsprotein in Bakterienzellen exprimiert wird, das ein N-terminales Bakteriophagen T4 Gen 55 enthält, das das gewünschte PTH Polypeptid an der C-Terminus hier von gebunden aufweist, und wenn nötig, ein C₂₋₆Alkoxy carbonyl oder wahlweise substituierten C₁₋₈Alkyl, C₂₋₈Alkenyl, C₂₋₈Alkinyl, Aralkyl, Aralkenyl, oder C₃₋₆Cycloalkyl-C₁₋₄alkyl Rest an die endständige Aminogruppe und/oder Seitenkettenaminogruppe der PTH Verbindung in geschützter oder ungeschützter Form eingeführt wird, und erforderlichenfalls die in der geschützten Form vorkommende Schutzgruppe entfernt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, worin das Fusionsprotein einen chemisch spaltbaren Linker

- zwischen dem Gen 55 und der gewünschten PTH Verbindung aufweist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, worin der chemisch spaltbare Linker eine der Aminosäuresequenzen Asp-Pro-Pro oder Asn-Gly-Pro aufweist.
- 5 9. Nukleotidsequenz, die für ein Fusionsprotein kodiert, das ein N-terminales Bakteriophagen T4 Gen 55 Polypeptid und eine gewünschte PTH Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 an der C-Terminus hiervon gebunden enthält.
- 10 10. Bakterieller Expressionsvektor, der eine DNA Sequenz nach Anspruch 9 enthält.
11. Bakterielle Wirtzelle, die mit einer DNA Sequenz nach Anspruch 9 oder einem bakteriellen Vektor nach Anspruch 10 transformiert ist.
12. Fusionsprotein, das ein N-terminales Bakteriophagen T4 Gen 55 Polypeptid und eine PTH Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5 an der C-Terminus hiervon gebunden ent-
hält.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine PTH Verbindung nach Anspruch 1 in freier Form oder in einer pharmazeutisch annehmbaren Salzform oder Komplexform zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Verdünnungsmittel oder Träger hierfür enthält.
14. PTH Verbindung nach Anspruch 1 in freier Form oder in einer pharmazeutisch annehmbaren Salzform oder Komplexform zur Verwendung für die Herstellung einer pharmazeuti-
schen Zusammensetzung zur Verbesserung der Knochenbildung.
15. PTH Verbindung nach Anspruch 1 in freier Form oder in einer pharmazeutisch annehmbar-
en Salzform oder Komplexform zur Verwendung für die Herstellung einer pharmazeuti-
schen Zusammensetzung mit einem Knochenresorptionsinhibitor zur Verbesserung der
Knochenbildung.

25

KEINE ZEICHNUNG

30

35

40

45

50

55