

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-862**  
(22) Přihlášeno: **02.09.1998**  
(30) Právo přednosti: **09.09.1997 US 1997/58324**  
(40) Zveřejněno: **13.09.2000**  
**(Věstník č. 9/2000)**  
(47) Uděleno: **19.11.2007**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **27.12.2007**  
**(Věstník č. 52/2007)**  
(86) PCT číslo: **PCT/EP1998/005550**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/012561**

(11) Číslo dokumentu:

## 298 701

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:  
**A61K 38/29** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 95/02610 A1; WO 97/07815 A2; WO 94/01460 A1; WO 96/40775 A1; WO 95/11697 A1; WO 97/02834 A1; WO 94/02510 A2; WO 96/40193 A1.

(73) Majitel patentu:

F. HOFFMAN-LA ROCHE AG, Basle, CH

(72) Původce:

Vickery Brian Henry, Los Altos Hills, CA, US

(74) Zástupce:

Dr. Karel Čermák, Národní třída 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Léčivo pro hojení kostí a reparaci zlomenin**

(57) Anotace:

Použití polypeptidového analogu peptidu příbuzného parathyroidálnímu hormonu (PTHrP) a jeho solí, kde aminokyselinové zbytky 22-31 uvedeného analogu PTHrP tvoří amfipatickou  $\alpha$ -šroubovici, Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu, kde Xaa je aminokyselinový zbytek s pozitivním nábojem, pro přípravu léku pro hojení kostí a reparaci zlomenin.

**CZ 298701 B6**

**Lék pro hojení kostí a reparaci zlomenin**Oblast techniky

5

Vynález se týká použití polypeptidového analogu peptidu příbuzného parathyroidálnímu hormonu (PTHrP) a jeho solí, kde aminokyselinové zbytky 22–31 uvedeného analogu PTHrP tvoří amfipatickou  $\alpha$ -šroubovici, pro přípravu léku pro určité nové lékařské indikace. Thematicky je možno vynález zařadit do oboru léčení kostí a reparace zlomenin.

10

Dosavadní stav techniky

Ve Spojených Státech Amerických je ročně popisováno přibližně 8 až 10 milionů fraktur, z toho více než 1 milion vyžaduje hospitalizaci. Roční náklady na léčbu těchto zlomenin přesahují 20 miliard dolarů. Ačkoliv je tato částka již nyní vysoká, předpokládá se, že se bude zvyšovat z důvodů stárnutí populace. Ačkoliv existuje několik způsobů léčby pro prevenci ztráty kostní hmoty spojenou se stárnutím, existuje pouze málo terapeutických postupů pro léčbu již vzniklých zlomenin. Většina z těchto postupů pro léčbu již vzniklých zlomenin. Většina z těchto léčebných způsobů vyžaduje lokální aplikaci, která je nežádoucí vzhledem ke komplexnosti podání a špatné spolupráci pacienta. Proto jsou žádoucí jiné metody usnadňující hojení kostí a zlomenin.

Nově bylo popsáno, že intermitentní léčba parathyroidálním hormonem (PTH) zlepšuje hojení zlomenin u krys po ovariectomii, což naznačuje, že léčba PTH může být potenciálně přínosná při léčbě zlomenin při postmenopausální osteoporose (H.W. Kim et al., Transactions of the 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Orthopaedics Research Society, svazek 22, sekce 1, Abstrakt 181–31, Únor 9–13, 1997; H.W. Kim et al., Journal of Bone and Mineral Research, svazek 11, Supplement 1, strana S152, Abstract P248 (8/1996)). Jiní výzkumníci popsali, že implantace matrice s aktivovaným genem exprimujícím kostní morfogenetický protein 4 a/nebo fragment PTH (aminokyseliny 1–34) do segmentovaného defektu krysího modelu fraktur způsobuje tvorbu nové kosti, která přemostňuje mezeru rychleji než u neléčených kontrol (Jianming Fang et al., Proc. Natl. Acad. Sci (USA), svazek 93: 5753–5758 (6/1996)). Různé analogy PTH byly také popsány jako užitečné pro léčbu osteoporosy (patenty US. 5 556 940 a US 5 559 792). Mezi další způsoby pro hojení zlomenin patří použití lidského destičkového faktoru 4 (patent US 5 622 935), benzothiofenů (patent US 5 502 074) a 24,25(OH)<sub>2</sub> vitamínu D<sub>3</sub> (patent US 5 069 905).

Peptid příbuzný PTH (PTHrP), dříve známý jako faktor odpovědný za humorální hyperkalcemii u malignit, je peptid tvořený 138–174 aminokyselinami (v závislosti na alternativním sestřihu), který se váže na PTH/PTHrP receptor. N-koncová aminokyselinová sekvence 34 aminokyselin PTHrP má omezenou homologii sekvence s příslušnou sekvencí PTH, ale v některých případech vykazuje podobnou aktivitu jako PTH. Nicméně, PTHrP je obecně méně účinný a má menší kostní anabolický účinek než PTH a nebyl spojován s hojením zlomenin. Sekvence hPTHrP (1–34) je následující:

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
1 5 10 15

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu  
20 25 30

Ile His Thr Ala (SEQ ID NO: 1)

45

Bylo popsáno několik zkrácených homologů a analogů PTHrP. Analogy, ve kterých jsou aminokyseliny 22–31 PTHrP (1–34) nahrazeny amfipatickou  $\alpha$ -šroubovicí (patent US 5 589 452 a WO 97/07 815) a příbuzné deriváty byly popsány jako použitelné pro léčbu osteoporózy (B.H. Vickery et al., J. Bone and Mineral Research, 11(12): 1943–1951; D. Leaffer et al., Endocrinology, 136(8): 3624–3631 (1995)). Bylo prokázáno, že monocyklické a bicyklické analogy PTHrP (1995)). Bylo prokázáno, že monocyklické a bicyklické analogy PTHrP (1–34) a PTHrP(7–34) se silně váží na receptor pro PTH a stimulují (nebo antagonizují) aktivitu adenylat cyklyazy stimulo-

5

#### Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití polypeptidového analogu peptidu příbuzného parathyroidálnímu hormonu (PTHrP) a jeho solí, kde aminokyselinové zbytky 22–31 uvedeného analogu PTHrP tvoří amfipatickou  $\alpha$ -šroubovicí

15

Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu

Kde Xaa je aminokyselinový zbytek s pozitivním nábojem, pro přípravu léku pro hojení kostí a reparaci zlomenin.

20

Když jsou ilustrativní provedení této amfipatické šroubovice vloženy do sekvence PTHrP, zejména do forem lidského PTHrP s N-koncovým zkrácením (zbytky 1–32 až 1–38), kde jsou výsledné peptidy účinné v hojení kostí a zlomenin. Systematické podání je výhodným způsobem podání.

25

#### Přehled obrázků na výkresech

30

Obr. 1 ukazuje jednou týdně měřenou radiografickou densitu segmentovaného kostního defektu na krysím modelu zlomeniny během 5 týdnů léčby analogy B nebo C PTHrP ve srovnání s kontrolou. Je vidět, že po 4 týdnech byl růst kosti v defektech u zvířat léčených analogy PTHrP vyšší než u kontrolních zvířat. PTHrP analogy B a C jsou  $(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{Ala}^{19}\text{pPTHrP}(1-34)\text{NH}_2$  a  $(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{His}^{26}\text{hPTHrP}(1-34)\text{NH}_2$ , v příslušném pořadí.

35

Obr. 2 ukazuje poměr radiografické density segmentované kosti ke kontrolaterárnímu femuru (kontrola) na krysím modelu segmentovaného defektu po šesti týdenní léčbě kontrolním činidlem nebo PTHrP analogy B nebo C. Krysí léčené PTHrP analogy B nebo C měly vyšší kostní densitu vzhledem ke krysám léčených kontrolním činidlem.

40

Obr. 3 ukazuje radiografické snímky s vysokým rozlišením kostních defektů na krysím modelu segmentovaného defektu po šesti týdenní léčbě kontrolním činidlem (3A) nebo PTHrP analogem C (3B). Snímky ukazují, že defekt u kontrol zůstal nespojen, zatímco defekt léčený PTHrP analogem C byl zhojen.

45

Obr. 4A a 4B ukazují hojení intramembranózního kostního defektu u králíků po léčbě PTHrP analogem D,  $(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{hPTHrP}-(1-34)\text{NH}_2$ , za použití dvou různých dávek.

50

Obr. 5 ukazuje počet zhojení dosažených u modelu kortikosteroidy indukovaného oddálení hojení fraktur za použití PTHrP analogu D,  $(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{hPTHrP}-(1-34)\text{NH}_2$ .

Dále je uveden podrobný popis předkládaného vynálezu.

Jedno- a třípísmenné zkratky pro různé běžné nukleotidové báze a aminokyseliny jsou podle doporučení popsaného v Pure Appl. Chem. 31: 639–645 (1972) a 40:277–290 (1974). Zkratky představují L aminokyseliny, pokud nejsou označeny jako D nebo D,L. Některé aminokyseliny, jak přirozené, tak syntetické, jsou achirální. Všechny peptidové sekvence jsou vedeny s N-koncovou aminokyselinou vlevo a C-koncovou aminokyselinou vpravo.

Je třeba si uvědomit, že v analogách PTHrP podle předkládaného vynálezu mohou být přítomny jak přirozené, tak syntetické aminokyseliny. Příklady syntetických aminokyselin a jejich zkratky jsou homoserin (hSer), homoseerinlaktón (hSerlac), homocystein (Hcy), homoarginin (hArg), homocitrullin (Hci), penicillamin (Pen), N- $\alpha$ -methylarginin (N-MeArg), norleucin (Nle), norvalin (Nval), norisoleucin (Nile), N-methylisoleucin (N-Melle), fenyglycin (PhG), t-butylglycin (Tle), hydroxyprolin (Hyp), 3,4-dehydroprolin (-Pro), peroglytamin (Pyr, Glp), ornithin (Orn), kyselina 1-aminoisomáselná (1-Aib), kyselina 2-aminoisomáselná (2-Aib), kyselina 2-aminomáselná (2-Abu), kyselina 4-aminomáselná (4-Abu), kyselina 2,4-diaminomáselná (A2bu), kyselina aminokorková (Asu), albizzin (Abz),  $\beta$ -cyklohexylalanin (Cha), 3-(1-naftyl)alanin (1-Nal), 3-(2-naftyl)alanin (2-Nal), citrullin (Cit), kyselina pipekolinová (Pip), 4-chlorfenylalanin (4-CIPhe), 4-fluorfenylalanin (4-FPhe), sarkosin (Sar) a kyselina 1-aminopropankarboxylová (1-NCPC). Jak přirozené, tak syntetické 1-aminopropankarboxylová (1-NCPC). Jak přirozené, tak syntetické aminokyseliny jsou komerčně dostupné od dodavatelů jako je NovaBiochem (San Diego, CA, USA) a Bachem (Torrance, CA, USA).

Analogy PTHrP polypeptidu jsou označeny s ohledem na rozdíl od přirozené sekvence hPTHrP. Zkratka (MAP<sub>1-10</sub>) se týká konkrétní následující amfipatické helikální sekvence:

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

kteřá je MAP sekvencí o deseti aminokyselinových zbytcích.

Proto sekvence označená jako (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>hPTHrP(1-34) znamená 1-34 N-koncových zbytků hPTHrP se segmentem mezi zbytky 22-31 nahrazeným MAP sekvencí. V MAP sekvencí mohou být označeny další varianty. Tak (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>His<sup>26</sup>PTHrP(1-34) znamená 1-34 N-koncových zbytků hPTHrP se segmentem mezi zbytky 22-31 nahrazených MAP sekvencí, ve které je histidin v pozici 26 (místo lysinu ve standardní MAP sekvencí).

Další variace vzhledem k přirozené sekvencí jsou označeny podobně. (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>Pro<sup>32</sup>hPTHrP(1-32) znamená 1-32 N-koncových zbytků hPTHrP s MAP sekvencí v pozici 22-31 a prolinem v pozici 32 (místo histidinu v přirozené sekvencí). (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>D-Orn<sup>34</sup>laktamhPTHrP(1-34) znamená 1-34 N-koncových zbytků hPTHrP s MAP sekvencí v pozici 22-31 a ornitinem v pozici 34, s vytvořeným laktamem mezi amino-skupinou vedlejšího řetězce ornitinu a karboxy-koncem. (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>hSer<sup>34</sup>hPTHrP(1-34) Thr His Ile Gln NH<sub>2</sub> znamená 1-34 N-koncových zbytků hPTHrP s MAP sekvencí v pozici 22-31, homoserinem v pozici 34 a další sekvencí Thr His Ile Gln v pozicích 35-38 a karboxy-koncem jako primárním amidem.

Polypeptidy s cyklizovanými vazbami mezi aminokyselinovými zbytky jsou označeny se dvěma zbytky tvořícími vazbu v závorkách a s předponou „c“. Obecně, vazby mezi dvěma zbytky jsou tvořeny mezi skupinami vedlejších řetězců, obvykle jako amidové nebo esterové vazby. Tak (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>c[Lys<sup>13</sup>, Asp<sup>17</sup>]hPTHrP-(1-34)hSer<sup>34</sup>laktón označuje 1-34 N-koncových zbytků hPTHrP se segmentem mezi zbytky 22-31 nahrazeným MAP sekvencí, amino-vedlejší řetězcem lysinu v pozici 13 cyklizovaným na karboxylový vedlejší řetězec aspartatu v pozici 17 a dalším homoserinem v pozici 34, s vytvořeným laktómem mezi hydroxylovým vedlejší řetězcem homoserinu a karboxy-koncem. Podobně, (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>c[Lys<sup>13</sup>, Asp<sup>17</sup>]hPTHrP-(1-34) označuje 1-34 N-koncových zbytků hPTHrP se segmentem mezi zbytky 22-31 nahrazeným MAP sekvencí a amino-vedlejší řetězcem lysinu v pozici 13 cyklizovaným na karboxylový vedlejší řetězec aspartatu v pozici 17.

Termín „polypeptidový analog PTHrP“ označuje polypeptid mající přijatelné substituce, delece nebo inserce vzhledem k PTHrP, nebo polypeptid s významnou homologií k PTHrP, který má podobnou fyziologickou aktivitu jako PTHrP.

- 5 Termín „fyziologicky aktivní zkrácený analog PTHrP“ označuje polypeptid mající sekvenci složenou z menší než úplné aminokyselinové sekvence PTHrP, který má, nicméně, podobné fyziologické účinky. Zkrácené analogy PTHrP nemusí být zcela homologické s PTHrP, aby mohly vyvolat podobné fyziologické reakce. Obvykle jsou zkrácené analogy zkráceny na C-konci a jsou tvořeny 30–40 zbytky, a výhodnými, ale ne jedinými příklady jsou PTHrP(1–32), PTHrP(1–34) PTHrP(1–38). Obecně obsahují analogy konzervativní aminokyselinové substituce podle v oboru přijímaných parametrů, jako jsou popsány dále.

- 15 Termín „významně homologický“ použitý v souvislosti s polypeptidy, znamená, že daný polypeptid má alespoň 80% homologii, lépe přibližně 90% homologii a nejlépe 95% homologii s referenčním polypeptidem. Homologie polypeptidů je obvykle měřena za použití softwaru pro analýzu sekvence (Viz například Sequence Analysis Software Package of Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705, USA).

- 20 Termín „amfipatická  $\alpha$ -šroubovice“ označuje sekundární strukturu polypeptidů, ve které mají aminokyseliny přijímající konfiguraci  $\alpha$ -šroubovice opačné polární a nepolární strany orientované podél dlouhé osy šroubovice. Amfipatická helikální sekvence může být navržena odborníkem v oboru. Konkrétní amfipatické helikální sekvence vhodné pro použití podle předkládaného vynálezu jsou po drobněji popsány například v patentu US 5 589 452 nebo WO 97/07 815.

- 25 Předkládaný vynález je založen na zjištění, že některé analogy PTHrP obsahující amfipatickou  $\alpha$ -šroubovici v pozici 22–31 jsou účinné v hojení kostí a zlomenin.

- 30 Je třeba si uvědomit, že kromě amfipatické šroubovice mezi pozicemi 22 a 31 mohou být v sekvenci PTHrP připraveny různé substituce, delece a inserce aminokyselin mimo tento region, za zachování trojrozměrné struktury polypeptidu. Příkladné varianty PTH a PTHrP sekvence, které zachovávají fyziologickou aktivitu výsledných analogů jsou popsány v patentech US 5 599 792, US 5 556 940, US 5 607 915 a US 5 589 452 a ve WO 91/06 564, WO 94/02 510, WO 95/11 697, WO 96/40 193 a WO 97/07 815. Další varianty, které by měly mít zachovanou fyziologickou aktivitu, mohou být připraveny v oboru známými technikami modelování proteinové struktury. Příklady technik pro přípravu takových variant jsou popsány například v L. Ladunga and R.F. Smith, Protein Eng., 3: 187–196 (1997) a v M.J. Thompson and R.A. Goldstein, Proteins, 1: 28–37 (1996).

- 40 Substituční varianty jsou ty, ve kterých je alespoň jedna aminokyselina přirozené sekvence odstraněna a na její místo ve stejné pozici je umístěna jiná aminokyselina. Substituce může být jediná, kdy je nahrazena pouze jedna aminokyselina, nebo mnohotná, při které jsou nahrazeny dvě nebo více aminokyselin. Obecně je dovolena jakákoliv konzervativní substituce. V takových případech se očekává, že analog vytvořený substitucí jedné hydrofilní aminokyseliny za jinou hydrofilní aminokyselinu si uchová podobnou aktivitu pro hojení zlomenin jako jeho prekurzor. Substituční varianty také zahrnují ty analogy PTHrP, ve kterých je C-koncový zbytek přítomen jako amid. Další substituce mohou být připraveny za použití aminokyselin, které jsou buď nabitě, nebo bez náboje. Každá z těchto skupin může být dále rozdělena do podskupin, pro další usnadnění substitucí.

- 50 Aminokyseliny s nábojem:

Acidické zbytky: kyselina asparagová, kyselina glutamová, kyselina 2-aminokorková;

Bazické zbytky: lysin, arginin, histidin, ornithin.

Aminokyselin bez náboje:

Hydrofilní zbytky: serin, threonin, asparagin, glutamin, methionin;

Alifatické zbytky: glycin, alanin, valin, leucin, norleucin, isoleucin;

Nepolární zbytky: cystein, homocystein, methionin, prolin;

Aromatické zbytky: fenylalanin, tyrosin, tryptofan, histidin.

5

Alternativně mohou být aminokyselinové substituce provedeny na principu biosterismu. Takové biosterické substituce obvykle minimalizují jakékoliv rušivé ovlivnění konformace, které může způsobit náhodná substituce. Technika alaninového skenování může být použita pro identifikaci pozic, ve kterých lze očekávat, že se při isosterické substituci získá varianta se zachovanou fyziologickou aktivitou (viz například K.H. Pearce Jr., M.H. Ultsch, R.F. Kelly, A.M. de Vos a J.A. Wells, *Biochemistry*, 35 (32): 10300–10307 (1996) a B. Li, J.Y. Tom, D. Oare, R. Yen, W.J. Fairbrother, J.A. Wells a B.C. Cuninghame, *Science*, 270: 1657–1660 (1995)). Příklady isosterických aminokyselin jsou uvedeny v následující tabulce:

10

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

15

Deleční varianty jsou ty varianty, ve kterých jsou jedna nebo více aminokyselin v přirozené sekvenci odstraněny. Deleční varianty budou mít jednu nebo dvě aminokyseliny deletované v určité oblasti molekuly. Je pravděpodobné, že delece bude připravena na konci sekvence, hlavně na karboxy-konci. Proto, ačkoliv jsou výhodné PTHrP(1–34) fragmenty, mají sekvence zkrácené na karboxy-konci také příznivé účinky na hojení kostí.

20

5 Inerční nebo adiční varianty jsou ty varianty, ve kterých je aminokyselina insertována do sousedství aminokyseliny v určité pozici přirozené sekvence. Sousedství v této souvislosti znamená vazbu buď na  $\alpha$ -karboxy-, nebo na  $\alpha$ -amino- skupinu aminokyseliny. Je také pravděpodobné, že adice nebo inserce budou připraveny na koncích sekvence, hlavně na karboxy-konci.

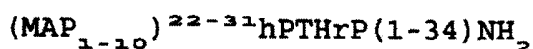
Z výše uvedených modifikací přirozené sekvence jsou výhodné substituce a adice v oblasti karboxy-konce.

10 Polypeptidové analogy PTHrP, které jsou použitelné pro hojení zlomenin, jsou částečně popsány v patentu US 5 589 452 a WO 97/07 815. Dalšími analogy jsou cyklické analogy N-koncové hPTHrP(1-32), hPTHrP(1-34) a hPTHrP(1-38) sekvence obsahující MAP sekvenci mezi pozicemi 22 a 31 a volitelně obsahující zbytky v pozici 13 a 17 a/nebo 26 a 30 vázané prostřednictvím skupin vedlejších řetězců. Odborníkům v oboru bude jasné, že v pozicích 13 a 17 je možno připravit různé substituce, které umožní cyklizaci mezi těmito dvěma pozicemi.

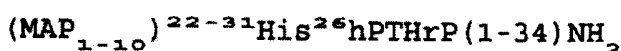
15 Analogy PTHrP z jakéhokoliv druhu, například lidské, hovězí, prasečí nebo králičí, mohou být použity v předkládaném vynálezu; výhodně je použit lidský PTHrP. Odborníkům v oboru bude jasné, že substituční, deleční a inserční varianty výhodných provedení uvedených dále, provedené podle obecných zásad uvedených výše, spadají také do rozsahu předkládaného vynálezu.

20 Mezi výhodná provedení patří použití analogů hPTHrP(1-34) s MAP sekvencí v pozici 22-31, hlavně ta, která mají pozitivně nabitou aminokyselinu v pozici 26, například lysin nebo histidin. Konkrétními provedeními této třídy jsou:

25



Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr Ala NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 3); a



Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu His Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr Ala NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 4).

30 Mezi jiná výhodná provedení patří použití analogů hPTHrP(1-34) s MAP sekvencí v pozici 22-31, které dále obsahují mono- nebo bicyklickou strukturu vytvořenou cyklizací mezi skupinami vedlejších řetězců aminokyselinových zbytků, konkrétně mezi zbytky 13 a 17 nebo mezi zbytky 26 a 30. Skupinami vedlejších řetězců jsou obvykle amino-, hydroxy- nebo karboxy-skupiny a cyklizace je provedena prostřednictvím amidové nebo esterové vazby. Zbytky s amino-skupinou na vedlejším řetězci jsou lysin a ornitin. Zbytky s karboxylovou skupinou na vedlejším řetězci jsou kyselina asparagová a kyselina glutamová.

35 Konkrétními provedeními této třídy jsou:

$(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{C}[\text{Lys}^{13}, \text{Asp}^{17}]\text{hPTHrP}(1-34)\text{hSer}^{34}\text{lakton}$

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

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

$(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{C}[\text{Lys}^{13}, \text{Asp}^{17}]\text{hPTHrP}(1-34)\text{NH}_2$

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

┌  
Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu  
Leu Glu Lys Leu His Thr Ala  $\text{MH}_2$  (SEQ ID NO: 6).

- 5 Dalšími analogy hPTHrP použitelným v předkládaném vynálezu jsou N-terminální sekvence o 30 až 50 zbytcích, výhodně o 1-32, 1-33, 1-34, 1-35, 1-36, 1-37 a 1-38 zbytcích, které mají MAP sekvenci v pozici 22-31 a volitelně mají jednu nebo více substitucí v pozici 5, 13, 17, 19, 26, 30, 32 nebo 34. Konkrétními provedeními této třídy jsou:

$(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{Ile}^5\text{hPTHrP}(1-34)\text{NH}_2$

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr Ala  $\text{NH}_2$  (SEQ ID NO: 7);

$(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{Ala}^{19}\text{hPTHrP}(1-34)\text{NH}_2$

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr Ala  $\text{NH}_2$  (SEQ ID NO: 8);

$(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{Pro}^{32}\text{hPTHrP}(1-32)\text{NH}_2$

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu Pro  $\text{NH}_2$  (SEQ ID NO: 9);

$(\text{MAP}_{1-10})^{22-31}\text{D-Orn}^{34}\text{laktamhPTHrP}(1-34)$

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



Leu His Thr D-Orn laktam (SEQ ID NO: 10);

(MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>hPTHrP(1-34)A2bu<sup>34</sup>laktam

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

(MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>hSer<sup>34</sup>PTHrP(1-34)THIQ NH<sub>2</sub>

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr hSer Thr His Ile Gln NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12).

- Obecně, všechny polypeptidy s významnou homologií ke konkrétním zde popsaným provedením jsou použitelné ve způsobech podle předkládaného vynálezu. Polypeptidy použité v předkládaném vynálezu budou nejméně z 50 %, lépe z více než 80 %, ještě lépe více než z 90 % a nejlépe z více než 95 % homologní k popsaným polypeptidům. Délka polypeptidové sekvence pro srovnání homologie bude nejméně 20 aminokyselin, obvykle alespoň 24 aminokyselin, lépe alespoň 30 aminokyselin a nejlépe 32 a 40 aminokyselin.
- Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být vyrobeny způsobem popsaným v patentu US 5 589 452 a WO 96/401 936 a WO 97/07 815. Sloučeniny jsou obvykle připraveny syntézou na pevné fázi, syntézou v roztoku nebo rekombinantní technikou, která spočívá v klonování a expresi genu kódujícího požadovaný polypeptid, kde všechny tyto techniky jsou známé v oboru. Syntéza na pevné fázi je výhodná pro zkrácené analogy PTHrP o 40 a méně aminokyselinách.
- Analogy s cyklickými vedlejšími řetězci jsou obvyčejně připraveny sestavením kompletního chráněného polypeptidu na pryskyřici, odstraněním chránících skupin a provedením cyklizace za použití vhodného kopulačního činidla, jako je například benzotriazol-1-yl-oxytris(pyrrolidino)-fosfoniumhexafluorofosfát (PyBOP), těsně před uvolněním polypeptidu z pryskyřice.
- Způsoby léčby podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro hojení kostních zlomenin a osteotomií, včetně srostlých a nesrostlých zlomenin. Mezi tyto zlomeniny, které je možno léčit způsoby podle předkládaného vynálezu, patří traumatické a osteoporotické zlomeniny, například zlomeniny kyčle, krčku femuru, zápěstí, obratlů, páteře, žeber, hrudní kosti, lauryngu a trachey, radiu, ulny, tibie, patelly, klíční kosti, pánve, humeru, dolní končetiny, prstů nohy a ruky, obličej a kotníku. Dalším použitím je usnadnění hojení kloubních náhrad, například páteře, kotníku a dolní končetiny, lokte a artrodes kyčle, ramena a kolena. Léčba analogy PTHrP podle předkládaného vynálezu je také indikována v souvislosti s ortoplastikami (včetně revisí, antroplastik) kyčle, kolena, ramena, lokte a podobně. Hojení kostí může být také zlepšeno u jiných chirurgických zásahů, jako je maxilofaciální chirurgie, stomatochirurgie nebo bunionectomie. Bylo také zjištěno, že analogy PTHrP akcelerují hojení jak v enchondrální kosti (příklady 1 a 2), která vzniká tvorbou chrupavčitého svalu, tak i intramembranózní kosti (příklad 3), která nevyžaduje tvorbu svalu. Hojení v intramembranózní kosti je zejména významné v případech, kdy je hojení zlomeniny zpomalené, například u diabetiků, kuřáků, starých pacientů, anemických pacientů a pacientů léčených kortikosteroidy (zejména chronicky léčených glukokortikoidy), NSAID či imunosupresivy.

Dávka analogu PTHrP nutná pro usnadnění hojení zlomenin podle předkládaného vynálezu závisí na závažnosti stavu, způsobu podání a dalších faktorech, které budou zhodnoceny ošetřujícím lékařem. Obvykle bude dávka v rozmezí od přibližně 0,01 do 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tělesné hmotnosti a den, lépe od přibližně 0,1 do 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  tělesné hmotnosti a den. Pro 50 kg člověka je denní dávka 5 aktivní složky od přibližně 0,5 do přibližně 100  $\mu\text{g}$ , lépe od přibližně 5 do přibližně 10  $\mu\text{g}$ . Tato dávka může být podána v běžném farmaceutickém prostředku v jedné dávce, ve více dávkách nebo v prostředku s kontrolovaným uvolňováním, podle toho, jaký způsob podání bude nejúčinnější. Podávání léčiva bude pokračovat do té doby, dokud bude trvat indikace, což v závislosti na závažnosti poranění může být několik týdnů až několik měsíců.

Oproti většině v současnosti dostupných způsobů pro léčbu zlomenin mohou být analogy PTHrP podány systémově. Příkladné způsoby podání jsou orální, parenterální (včetně podkožního, intramuskulárního a intravenosního), rektální, bukální (včetně sublinguálního), transdermální, pulmonální a intranasální. Typické systémy pro pulmování a intranasální podání jsou popsány v patentu US 5 607 915. Nasální podání analogů PTHrP je popsáno ve WO 97/07 815. Do způsobů léčby podle předkládaného vynálezu také patří systémové podání analogů PTHrP společně s lokální léčbou druhým činidlem podporujícím hojení kosti. Příklady takových činidel pro lokální podání jsou kostní morfogenní proteiny (BMP-2 a BMP-7), osteogenní proteiny (OP-1), růstové faktory jako je TGF- $\beta$ 1 a cytokiny jako je IFN- $\beta$ . Obvykle jsou tato činidla podána lokálně v různých nosičích, jako je hydroxyapatit a/nebo uhličitán vápenatý a amylopektin. Systémové podání analogů PTHrP může být také kombinováno s alternativními způsoby hojení zlomenin, jako je například mechanická nebo biofyzikální stimulace, například elektrinou nebo ultrazvukem.

Analogy PTHrP budou obvykle podány jako farmaceutický prostředek obsahující aktivní složku smísenou s farmaceuticky přijatelným, netoxickým nosičem. Jako bylo uvedeno výše, takové prostředky mohou být připraveny pro parenterální (včetně podkožního, intramuskulárního a intravenosního) podání, obvykle ve formě roztoků nebo suspenzí; pro orální nebo bukální podání, obvykle ve formě tablet nebo kapslí; pro intranasální podání, obvykle ve formě prášku, nosních kapek nebo aerosolů; a pro rektální nebo transdermální podání.

Kapalné prostředky pro parenterální podání mohou obsahovat jako přísadu sterilní vodu nebo salinický roztok, alkylenglykoly jako je propylenglykol, polyalkylenglykoly jako je polyethylen-glykol, oleje rostlinného původu, hydrogenované naftalaleny a podobně. Tyto prostředky mohou obsahovat mírně kyselé pufrы s pH v rozmezí od 4 do 6. Mezi vhodné pufrы patří acetát, askorbát a citrat v koncentracích od 5 mM do 50 mM. Pro orální podání mohou prostředky obsahovat dále žlučové sole nebo acylkarnitiny. Prostředky pro nasální podání mohou být v pevné formě a mohou obsahovat přísady, například laktoru nebo dextran, nebo to mohou být vodné nebo olejové roztoky pro použití ve formě nosních kapek nebo sprejů s odměřitelnou dávkou. Mezi konkrétní nasální prostředky patří inhalátory suchých prášků (DPI), kapalné roztoky nebo suspenze vhodné pro nebulizaci a prostředky obsahující hnací plyn vhodné pro použití v inhalátorech s odměřitelnou dávkou (MDI). Pro bukální podání jsou typickými přísadami cukry, stearan hořečnatý, stearan vápenatý, předželatinizovaný škrob a podobně.

Při použití prostředku pro nasální podání může být absorpce přes nasální slizniční membránu zesílena kyselinou s vlastnostmi surfaktantů, například kyselinou glykocholovou, kyselinou cholovou, kyselinou chenodeoxycholovou, kyselinou dehydrocholovou, kyselinou cyklodeoxycholovou, cyklodextriny a podobně, které jsou použity v množství od přibližně 0,2 do 15 % hmotnostních, výhodně od přibližně 0,5 do 4 % hmotnostních, nejlépe v množství přibližně 2 % hmotnostních.

Dlouhodobé, například jednotýdenní až jednoroční, podávání sloučeniny podle předkládaného vynálezu jedinci může být provedeno jedním podáním systému s kontrolovaným uvolňováním, který obsahuje dostatečné množství aktivní složky pro uvedené období. Pro tento účel mohou být použity různé systémy s kontrolovaným uvolňováním, jako jsou monolitické nebo zásobníkové mikrokapsle, depotní implantáty, osmotické pumpy, vesikuly, liposomy, transdermální náplasti,

iontoforetické prostředky a, alternativně, injekční dávkové formy. Lokalizace do místa, kde je žádoucí uvolňování aktivní složky, je dalším rysem některých prostředků s kontrovaným uvolňováním, který může být výhodný při léčbě některých onemocnění.

5

Příklady provedení vynálezu

Referenční příklad

Příprava tablet

10

Následující složky se důkladně promísí a stlačí se do tablet s jednou rýhou.

Složka	mg/tabletu
Sloučenina podle předkládaného vynálezu	400
Kukuřičný škrob	50
Kroskarmellosa sodná	25
Laktosa	120
Stearan hořečnatý	5

15

Příprava kapslí

Následující složky se důkladně promísí a vloží se do kapslí z tuhé želatiny.

Složka	mg/kapsli
Sloučenina podle předkládaného vynálezu	200
Laktosa, sušená rozprašováním	148
Stearan hořečnatý	2

20

Příprava suspenze

Následující složky se důkladně promísí za vzniku prostředku pro orální podání.

Složka	Množství
Sloučenina podle předkládaného vynálezu	1,0 g
Kyselina fumarová	0,5 g
Chlorid sodný	2,0 g
Methylparaben	0,15 g
Propylparaben	0,05 g
Granulovaný cukr	25,5 g
Sorbitol (70% roztok)	12,85 g
Veegum K (Vanderbilt Co.)	1,0 g
Chuťová korigens	0,135 ml
Barviva	0,5 mg
Destilovaná voda	q.s. 100 ml

Prostředek pro injekční podání

- 5 Následující složky se důkladně promísí za vzniku prostředku pro injekční podání.

Složka	Množství
Sloučenina podle předkládaného vynálezu	0,2 g
Puftr tvořený octanem sodným, 0,4 M	2,0 ml
HCl (1N) nebo NaOH (1N)	q.s. vhodné pH
Voda (destilovaná, sterilní)	q.s. 20 ml

Prostředky pro nasální podání

10

- Následující složky se důkladně promísí za vzniku prostředku pro nasální podání.

Složka	Množství
Analog PTHrP	20 mg/ml
Kyselina citronová	0,2 mg/ml
Citrat sodný	2,6 mg/ml
Benzalkoniumchlorid	0,2 mg/ml
Sorbitol	35 mg/ml
Taurocholát nebo glykocholát sodný	10 mg/ml

## Příklad 1: Hojení segmentovaných fraktur pomocí PTHrP

5 Modifikovaný krysí model segmentálního femorálního defektu byl použit pro demonstrování toho, že analogy PTHrP usnadňují hojení kosti a zlomenin (T.A. Einhorn et al., J. Bone Joint, 66: 274–279 (1984)).

10 Dospělí samci Sprague–Dawley krysy o hmotnosti přibližně 300 g byli krmeni Laboratory Rodent Diet 5001 (PMI Feeds, St. Louis, MO, USA) a vodou podle potřeby. Před chirurgickým zákrokem byla zvířata uvedena do anestezie i.p. injekcí ketaminu (80 mg/kg) a xylazinu (5 mg/kg). Pro profylaxi infekce byla intramuskulárně podána jedna dávka prokain–penicilinu.

15 Byl použit laterální přístup k femuru a předvrtaná dlah z polyethylenu s vysokou hustotou byla fixována podél předního kortexu femuru. Během toho postupu byl oškrábán periost. Ve střední části těla femuru byl vytvořen segmentální defekt nekritické velikosti 1 mm. Rána byla uzavřena nylonem a chronickým stehem.

20 Pooperačně byla zvířata umístěna v boxech se 48–hodinovým pooperačním přístupem ke krmným peletám. Zvířata byla kontrolována alespoň jednou denně a všechna zvířata vykazující jakékoliv známky onemocnění byla vyšetřena a byla jim podána vhodná terapie, pokud to bylo vhodné.

25 Krysy byly rozděleny do skupin uvedených v tabulce 1 a denně od pooperačního dne 1 jim bylo podkožně podáváno buď vehikulem (fyziologický roztok), nebo analog PTHrP podle předkládaného vynálezu. Zvířata byla usmrcena v 6 týdnech a byla porovnávána radiograficky.

30 Krysy pod sedací byly uloženy v poloze na břicho se zevně rotovanými zadními končetinami. Sériové radiografické snímky každého femuru (postiženého femuru a kontralaterálního femuru) byly provedeny každý týden od týdnu 1 po operaci. Pro kalibraci byl na každém snímku použit hliníkový fantom se známou hustotou. Každý snímek byl umístěn na prosvěcovací desku a byl vyfotografován za použití DSC 420 digitální Kodak kamery. Tyto snímky byly přeneseny do Gateway 2000 IBM kompatibilního počítače a digitalizovány za použití softwaru pro analýzu snímků (Sigma Scan<sup>R</sup>). Hranice defektu byly označeny a průměrná hustota plochy osteotomie byla měřena u léčených zvířat vzhledem ke kontrolním zvířatům. Obr. 1 ukazuje zvýšení hustoty kosti v defektu u léčených zvířat vzhledem ke kontrolním zvířatům v týdenních intervalech během prvních pěti týdnů terapie. Průměrná hustota kosti v defektu byla srovnávána také s průměrnou hustotou kontralaterálního femuru pro každý týden. Obr. 2 ukazuje poměr radiografické hustoty po 6 týdnech. Srovnání těchto kostních hustot ukazuje, že analogy PTHrP mají hojivé účinky na kost. Po utracení (6. týden) byly femury (pokusný a kontralaterální) vyjmuty bez měkkých tkání. Byly provedeny vysoce citlivé radiografy femurů v laterální rovině. Osteotomie byla považována za srostlou, když byla prokázána kontinuita kosti femuru ve více než 25 % průřezu defektu. Srovnání femurů od léčených zvířat s femury od neléčených zvířat ukázalo, že analogy PTHrP akcelerují hojení kosti a zlomeniny. Obr. 3 ukazuje reprezentativní radiografické snímky od kontrolního (obr. 1A) a léčeného (obr. 1B) zvířete.

45

Tabulka 1

Skupina	Sloučenina	Způsob podání	Počet zvířat	Utracení
1	kontrola	podkožní	10	6. týden
2	PTHrP analog B	podkožní	10	6. týden
3	PTHrP analog C	podkožní	10	6. týden

5

## Příklad 2: Hojení kosti v modelu uzavřené zlomeniny za použití analogů PTHrP

Použitý model uzavřené zlomeniny je Bonnarens/Eihornův model. (F. Bonnarens and T.A. Einhorn, J. Orthopaedic Research, 2: 97–101 (1984)). Byly použity stejné krysy jako v příkladu 1. V tomto modelu je intramedulární hřeb umístěn retrogradně do distálního ferumu za použití mediálního parapatelárního přístupu. Artrotomie je potom uzavřena neresorbovatelnými stehy a intramedulární hřeb je umístěn do správné lokalizace. Potom je trojbodovou svorkou vytvořena uzavřená transversální zlomenina. Zvířata jsou sledována a je provedeno stejné radiografické snímkování, jako v příkladu 1. Analogy PTHrP akcelerují hojení kostí a zlomenin v tomto modelu u léčených zvířat vzhledem ke kontrolním zvířatům.

15

## Příklad 3: Intramembranózní hojení kosti za použití analogů PTHrP

20

Králíci byly uvedeni do celkové anestezie a byl proveden chirurgický zákrok způsobující čtyři povrchové defekty, jeden na každém distálním femuru a jeden na každé proximální tibi. Byla provedena posterolaterální chirurgická incise velikosti přibližně 3 cm, pro obnažení distálního laterálního kondylu femoru. Kost proximálně ke kolennímu kloubu byla subperiostálně obnažena a byla vypláchnuta fyziologickým roztokem. Hluboké tkáně byly uzavřeny 3–0 chronickým stehem a subcutikulární vrstva byla uzavřena 3–0 nylonovým stehem a třemi až čtyřmi jednotlivými ocelovými stehy. Byla provedena druhá 3 cm incise na mediální straně proximální tibie a v proximální tibi byla na její mediální straně vyvrtána 5 mm díra. Rána byla uzavřena způsobem popsaným výše. Celý postup byl opakován na kontralaterální končetině.

25

30

Zásobního roztoku analogu C PTHrP ( $\text{MAP}_{1-10}$ )<sup>22-31</sup>His<sup>26</sup>hPTHrP (1–34)NH<sub>2</sub> a analogu D PTHrP, ( $\text{MAP}_{1-10}$ )<sup>22-31</sup>hPTHrP (1–34)NH<sub>2</sub> v koncentraci 800 µg/ml byly připraveny sterilní filtrací přes 0,22 mikronový filtr a ředěním ve vehikulu buď na koncentraci 20 µg/ml, nebo na koncentraci 100 µg/ml tělesně před podáním. Vehikulem byl 30 mg/ml manitol, 30 mg/ml sacharosa, 0,12 mg/ml Tween<sup>R</sup>80, 0,17 mg/ml kyselina octová a 2,33 mg/ml trihydratu octanu sodného. Analogy PTHrP v dávce 2 µg/kg/den nebo 10 µg/kg/den byly podávány denně podkožní injekcí zvířatům po chirurgickém zákroku.

35

Zvířata byla rentgenována jednou týdně po dobu trvání studie. Densitometrická měření byla provedena za použití transluminačního skeneru a MetaMorph<sup>TM</sup> (Universal Imaging, West Chester, PA) softwaru. Snímky dolních končetin byly provedeny ve vnitřní a zemní rotaci v dny 10 a 21 po operaci. Zvířata byla utracena v den 30 po operaci. Na konci studie byla zvířatům podána nadměrná dávka pentobarbitalu, byly odebrány tkáně z levého a pravého femuru a tibie a byly analyzovány rentgenologicky a histologicky.

45

Zvířata léčená analogy C a D PTHrP měla akcelerovanou tvorbu intramembranózní kosti ve srovnání se zvířaty léčenými vehikulem. Výsledky pro PTHrP analog D jsou uvedeny na obr. 4A

a 4B pro femur a tibií, v příslušném pořadí. V den 21 nebylo pozorováno kompletní vyhojení femorálních nebo tibiálních defektů u žádného z kontrolních zvířat, zatímco 40% femorálních a tibiálních defektů u zvířat, jimž byly podávány nízké dávky analogu, bylo zhojeno. V tu samou dobu bylo zhojeno 75 % tibiálních defektů a 50 % femorálních defektů u zvířat, jimž byly podávány vysoké dávky analogu. Po utracení potvrdila radiografická analýza vzorků zlepšení hojení u zvířat léčených analogem PTHrP, kde bylo ve skupině s vysokou dávkou 85 % tibiálních defektů vyplněno mineralizovanou tkání, zatímco méně než 10 % tibiálních defektů u kontrolních zvířat bylo při utracení vyplněno mineralizovanou tkání ( $p < 0,01$ ). Podobně, bylo zjištěno signifikantně vyšší procento vyplnění femorálních defektů ve skupině léčené PTHrP než v kontrolní skupině ( $p < 0,01$ ).

#### Příklad 4: Zlepšení hojení kosti v modelu unární osteotomie

Cílem tohoto pokusu bylo prokázat, že analogy PTHrP mohou zvyšovat biomechanickou pevnost (Část I) a kinetiku hojení (část II) v souvislosti se systémovou terapií kortikosteroidy v králičím modelu osteotomie.

Ve všech pokusech byly použity dospělí samci New Zealand White králíků. V části I bylo 10 králíků rozděleno do dvou stejných skupin a v části II bylo 20 králíků rozděleno do dvou stejných skupin. Bilaterálně u každého králíka byly vytvořeny defekty podkritické velikosti (1 mm). Po dobu 2 měsíců před chirurgickým výkonem do 6 týdnů po operaci byla všem králíkům podávána denně podkožní injekce buď prednisonu (0,15 mg/kg) ve sterilní vodě (pokusná skupina), nebo sterilního fyziologického roztoku (kontrolní skupina). Od prvního dne o operaci byly králíkům pokusné skupiny denně podávány podkožní injekce analogu D PTHrP (0,01 mg/kg), zatímco králíkům kontrolní skupiny byly podávány injekce normálního fyziologického roztoku. V části I byla zvířata utracena 6 týdnů po osteomii. V části II byla zvířata utracena po dosažení rentgenologického srůstu bilaterálně, nebo v případě, že nedošlo ke srůstu, 10 týdnů po operaci.

V obou částech pokusu byla radiografická intenzita a plocha hojení analyzovány každý druhý týden, s prvním hodnocením ve 2. týdnu (část I) nebo 4. týdnu (část II) po operaci. Byly provedeny sériové snímky předních končetin, které byly digitalizovány a kontrolní plocha byla analyzována za použití softwaru pro analýzu snímků (Sigma Scan Pro). Fotodensitometrie byla použita pro kvantifikaci obsahu minerálů v nově vytvořené kosti v místě osteotomie a pro hodnocení tvorby svalku. Po utracení byly provedeny faxitronové snímky s vysokou rozlišovací schopností na obě přední končetiny v anteroposteriorní a laterální rovině, které umožnily analýzu rozměrů a velikosti svalku v místě zlomeniny.

#### Výsledky – část I

U devíti z desíti končetin léčených analogem PTHrP D došlo ke srůstu během 6 týdnů, zatímco ve skupině léčené vehikulelem došlo ke srůstu pouze dvou z deseti končetin. Tyto výsledky jsou uvedeny na obr. 5. V šesti týdnech jak anterioposteriorní, tak laterální faxitronové vyšetření ukázaly významně vyšší intenzity míst osteotomie u léčených končetin vzhledem k neléčeným. Podobně, intenzita proximálních a distálních ulnárních diafýz byla statisticky významně vyšší u léčených končetin. Laterálně byla intenzita externích svalků také vyšší u léčených končetin. Při biomechanickém vyšetření byla torsní pevnost léčených končetin statisticky významně vyšší než pevnost kontrolních končetin, jak ve smyslu tuhosti, tak ve smyslu kroutivého momentu.

#### Výsledky – část II

Ve 4 týdnech byla u léčených končetin prokázána vyšší radiografická intenzita v místě osteotomie, zevních svalků a ulnárních diafýz, než u kontrolních končetin ( $p < 0,01$ ). Sečtené plochy svalků léčených končetin byly vyšší ( $p < 0,05$ ) a byl naznačený trend ukazující, že místo osteotomie mělo menší velikost. V 6 týdnech ukázalo radiografické vyšetření in vivo tendenci k vyšší

intenzitě v místě osteotomie u léčených končetin vzhledem ke kontrolním končetinám, ačkoliv nebyly prokázány rozdíly v intenzitě nebo ploše svalku. Radiograficky byly všechny končetiny léčené analogem PTHrP srostlé a všechna tato zvířata byla utracena v 6. týdnu. V 8. týdnu došlo ke srůstu čtyř dalších končetin (dvě zvířata) podle radiografického vyšetření a tato zvířata byla utracena. V 10. týdnu byla utracena ostatní zvířata, protože jejich končetiny nejevily tendenci dalšího hojení podle radiografického vyšetření během po sledních 4 týdnů a proto byly klasifikovány jako nesrostlé. U končetin léčených analogem PTHrP byla prokázána vyšší radiografická intenzita v místě osteotomie ( $p < 0,05$ ), stejně jako v ulnárních diafýzách a oblasti svalku. Plocha osteotomie byla statisticky významně menší u končetin léčených analogem PTHrP než u končetin léčených vehikulem. Proto v tomto modelu hojení zpomaleného kortikosteroidy vede léčba analogem PTHrP ke kontrolnímu zhojení během 6 týdnů, zatímco u 75 % neléčených končetin nedošlo ke zhojení během 10 týdnů.

15

### PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. Použití polypeptidového analogu peptidu příbuzného parathyroidálnímu hormonu (PTHrP) a jeho solí, kde aminokyselinové zbytky 22–31 uvedeného analogu PTHrP tvoří amfipatickou  $\alpha$ -šroubovici

Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu

25 kde Xaa je aminokyselinový zbytek s pozitivním nábojem, pro přípravu léku pro hojení kostí a reparaci zlomenin.

2. Použití podle nároku 1, kde lék má formu vhodnou pro nasální podávání.

30 3. Použití podle nároku 1, kde lék dále obsahuje do místa zlomeniny lokálně aplikovatelné druhé činidlo pro hojení kostí.

4. Použití podle nároku 1, kde zlomenina je v intramembranosní kosti.

35 5. Použití podle nároku 1, kde analog PTHrP je ve formě systemického léčiva.

6. Použití podle nároku 1, kde Xaa je lysin nebo histidin.

7. Použití podle nároku 6, kde analogem PTHrP je:

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr Ala NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 3); nebo

40 Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu His Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr Ala NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 4).

45 8. Použití podle nároku 1, kde analog PTHrP má alespoň dva aminokyselinové zbytky spojené navzájem prostřednictvím svých vedlejších řetězců.



9. Použití podle nároku 8, kde spojené aminokyselinové zbytky jsou v pozicích 13 a 17 nebo v pozicích 26 a 30.

5 10. Použití podle nároku 9, kde aminokyselinovým zbytkem v pozici 17 je kyselina asparagová.

11. Použití podle nároku 10, kde analogy PTHrP jsou:

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

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

nebo

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

┌──────────────────┐  
Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu  
Leu Glu Lys Leu His Thr Ala MH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 6).

10

12. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, kde analogem PTHrP je N-terminálně zkrácená sekvence o 30 až 50 aminokyselinách, která je popřípadě substituovaná v pozicích 5, 13, 17, 19, 26, 30, 32 a/nebo 34.

13. Použití podle nároku 12, kde analogem PTHrP je:

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr Ala NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 7);

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr Ala NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 8);

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu Pro NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 9);

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

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

nebo

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile  
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys  
Leu His Thr hSer Thr His Ile Gln NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12).

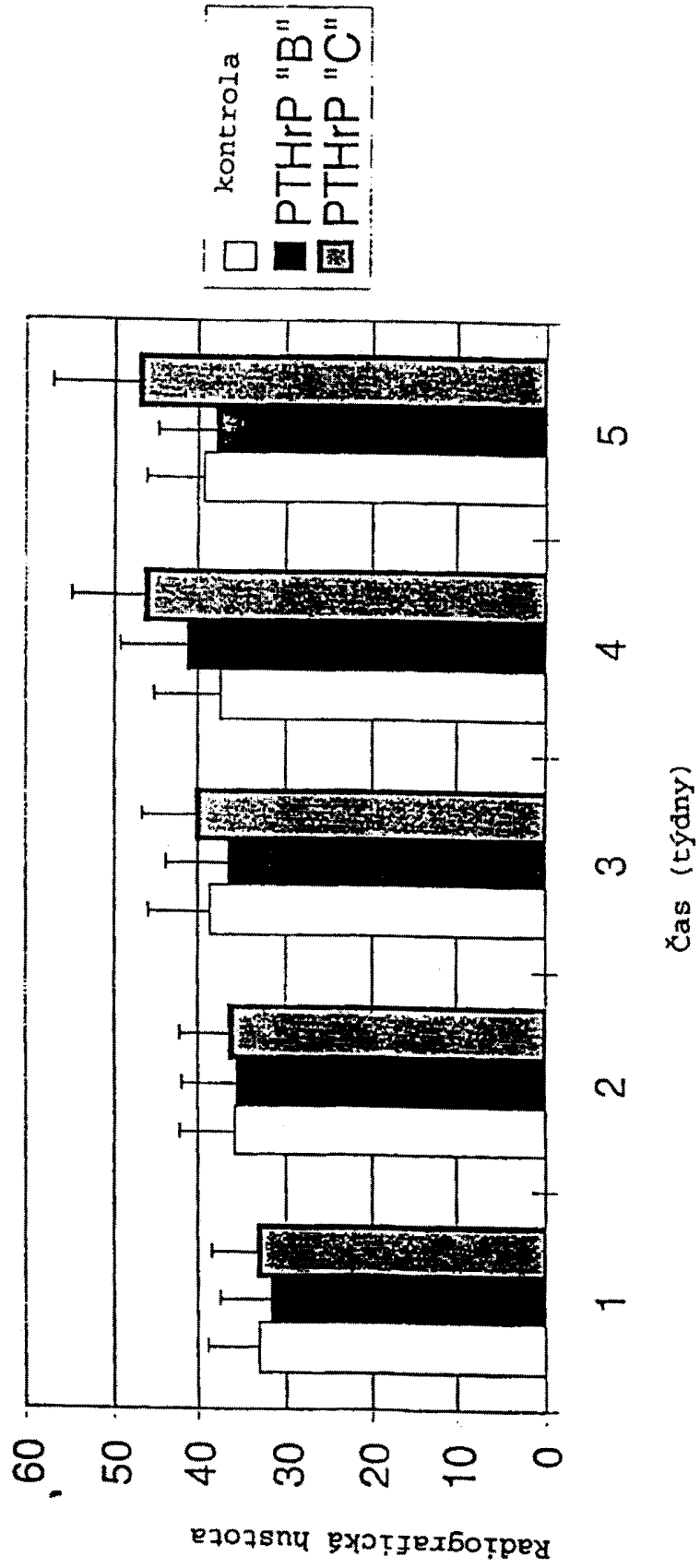
5

6 výkresů

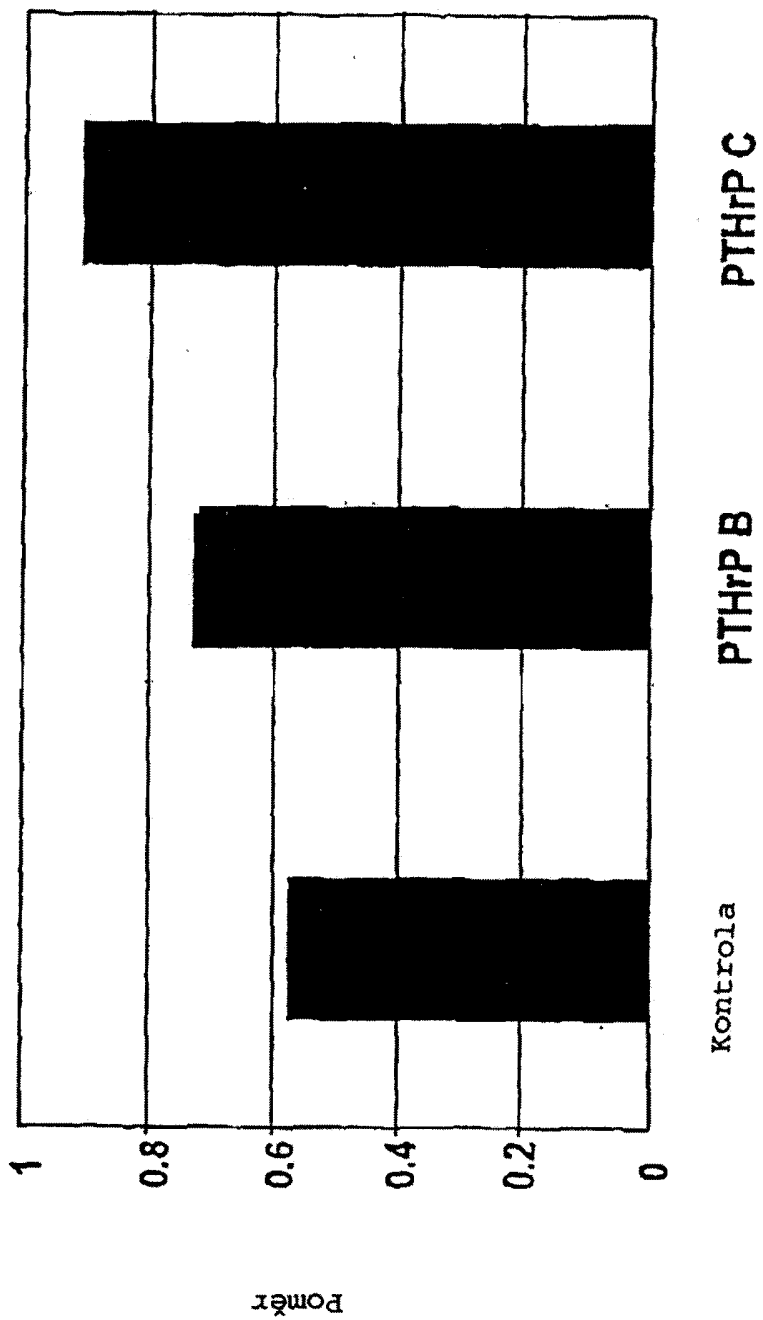
10

Obr. 1

PTHrP studie - defekt



Obr. 2  
 Poměr radiografických hustot defekt/kontralaterální končetina

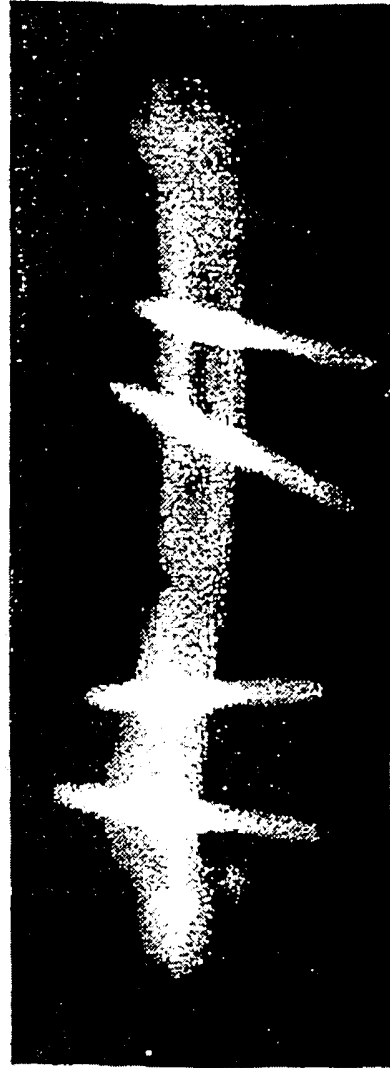


Týden 6

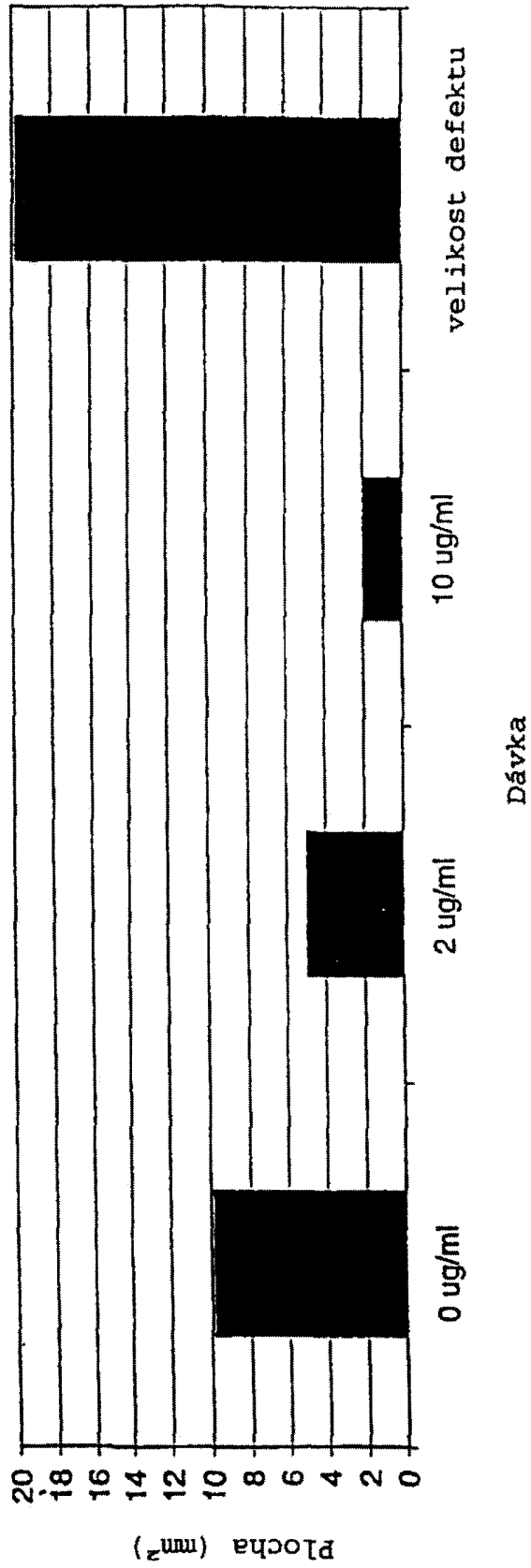
Obr. 3A Příklad radiografického snímku s vysokým rozlišením  
nesroslého defektu v 6. týdnu



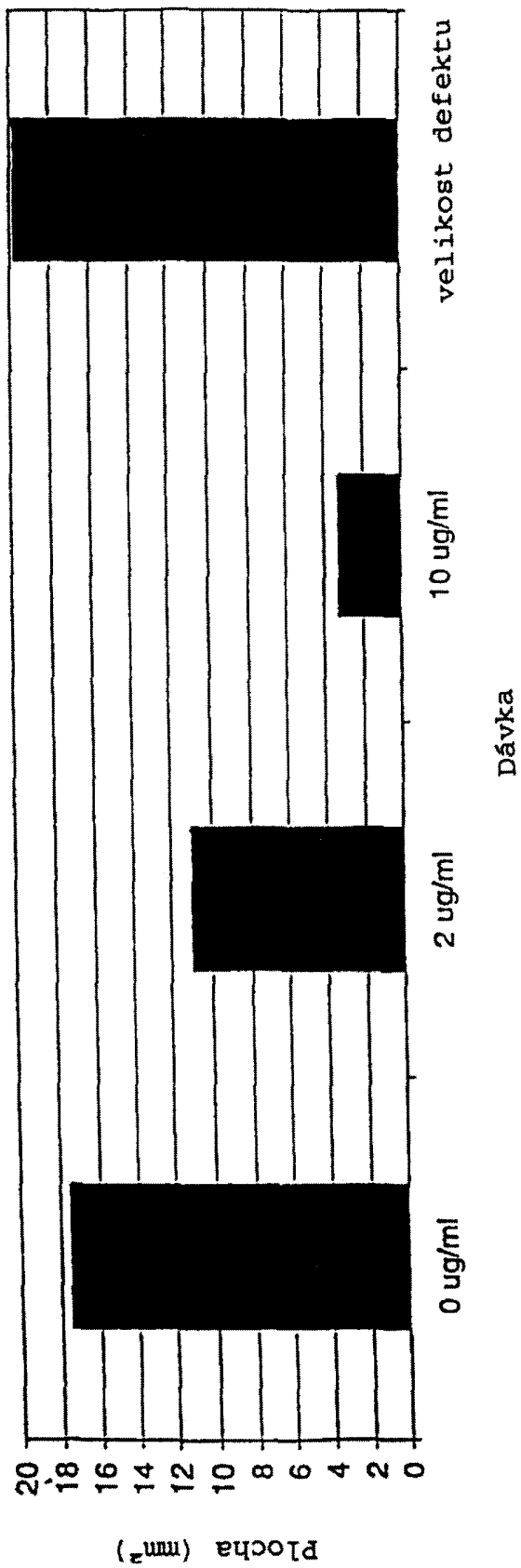
Obr. 3B Příklad radiografického snímku s vysokým rozlišením  
zhojeného defektu v 6. týdnu



Obr. 4A Trabekulární kost femuru

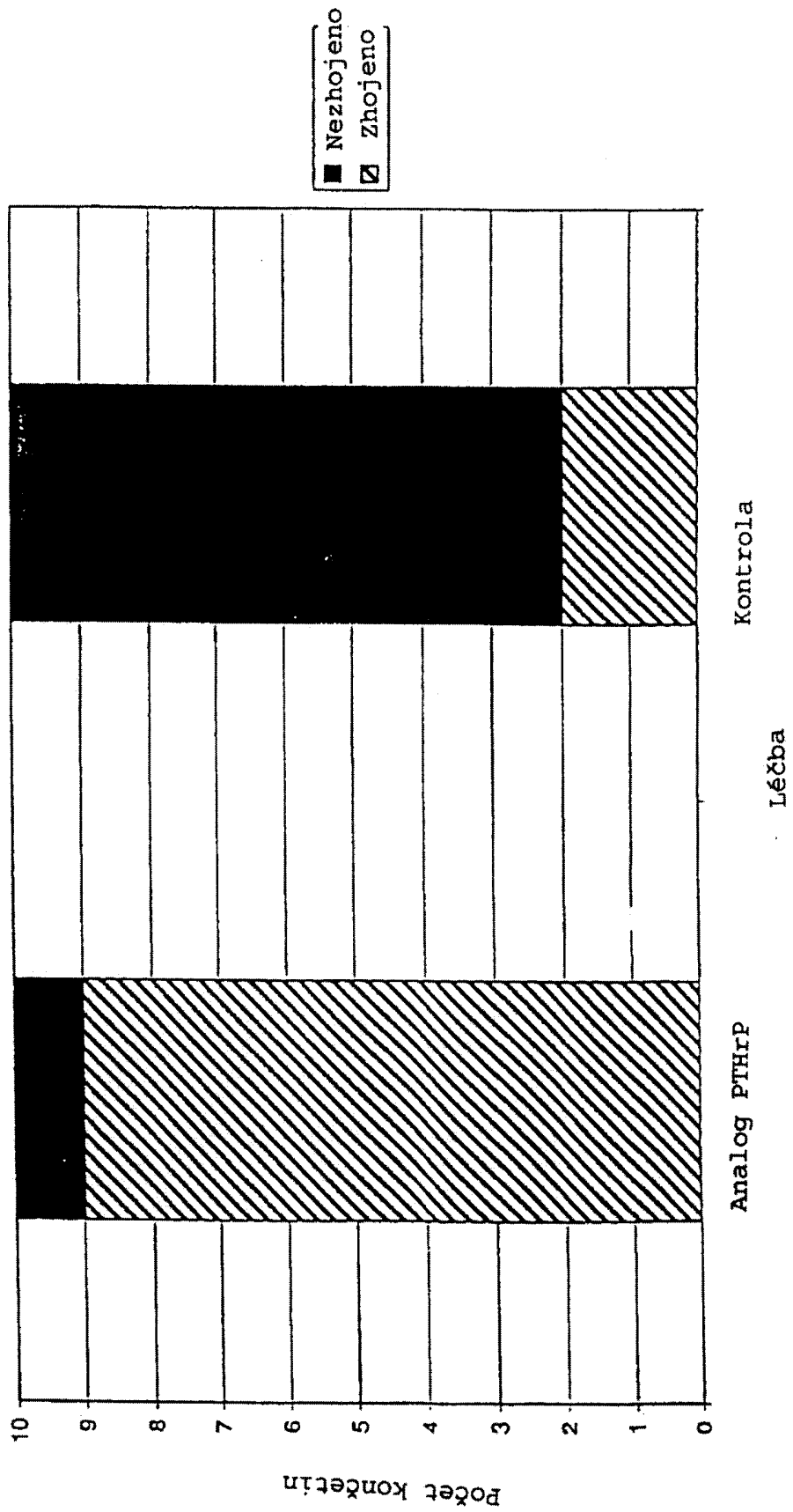


Obr. 4B  
Kortikalis tibie



Zhojení v 6. týdnu

Obr. 5



Konec dokumentu