



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 30 591 T2 2006.05.04

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 005 359 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 30 591.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/EP98/05550

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 951 341.1

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/012561

(86) PCT-Anmeldetag: 02.09.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 18.03.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 07.06.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 15.06.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 04.05.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: A61K 38/29 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

58324 P 09.09.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH

(72) Erfinder:

VICKERY, Henry, Brian, Los Altos Hills, US

(74) Vertreter:

Lederer & Keller, 80538 München

(54) Bezeichnung: HEILUNG VON BRUCHVERLETZUNGEN UNTER VERWENDUNG VON PTHrP ANALOGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Von ungefähr 8 bis 10 Millionen Knochenbrüchen wird jährlich in den Vereinigten Staaten berichtet, wobei mehr als 1 Million davon einen Krankenhausaufenthalt erfordern. Die geschätzten jährlichen Kosten zur Behandlung dieser Brüche überschreiten 20 Milliarden Dollar. Während dies bereits signifikant ist, wird erwartet, daß sich diese Zahlen aufgrund der Alterung der allgemeinen Bevölkerung erhöhen. Obwohl mehrere Therapien zur Vorbeugung des Knochenschwunds, der mit der Alterung verbunden ist, angegeben werden, gibt es wenige Therapien, die zur Behandlung angegeben werden, wenn ein Bruch auftrat. Die meisten erfordern lokale Verabreichung, die aufgrund der Komplexität der Abgabe und schlechten Patientenmitarbeit unerwünscht ist. Deshalb würde es wünschenswert sein, zusätzliche Verfahren zur Erleichterung der Knochenheilung und Bruchwiederherstellung zu haben.

**[0002]** Es ist kürzlich berichtet worden, daß die intermittierende Behandlung mit Nebenschilddrüsenhormon (PTH) die Bruchheilung bei Ratten, denen ein Eierstock entfernt wurde, verbessert, was zeigt, daß die PTH-Behandlung möglicherweise bei der Behandlung von Postmenopause-Osteoporose-Brüchen nützlich sein kann. (H. W. Kim et al.; Transaction of the 43rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Bd. 22, Abschnitt 1, Abstract 181–31, 9. Bis 13. Februar 1997; N. W. Kim et al.; Journal of Bone and Mineral Research, Bd. 11, Supplement 1, Seite S152, Abstract P248 (August 1996)). Andere Forscher berichteten, daß die Einpflanzung einer genaktivierten Matrix, die das morphogenetische Knochenprotein-4 exprimiert, und/oder ein Fragment von PTH (Aminosäuren 1 bis 34) in das segmentierte defekte Rattenbruchmodell die Bildung von neuem Knochen verursacht, der die Spalte schneller als eine unbehandelte Kontrolle überbrückt. (Jianming Fang et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) Bd. 93: 5753–5758 (Juni 1996)). Verschiedene PTH-Analoga sind ebenso für die Behandlung von Osteoporose als nützlich angegeben worden (US-Patente Nr. 5,556,940 und 5,559,792). Andere Verfahren der Bruchheilung umfassen die Verwendung des menschlichen Plättchenfaktors 4 (US-Patent Nr. 5,622,935), von Benzothiophenen (US-Patent Nr. 5,502,074) und 24,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> (US-Patent Nr. 5,069,905).

**[0003]** Das PTH-verwandte Peptid (PTHRP), das vorher als der Faktor bekannt war, der für die humorale Hyperkalziämie von Malignität verantwortlich ist, ist ein Peptid mit 138 bis 174 Aminosäuren (in Abhängigkeit des alternativen Splicings), das an den PTH/PTHRP-Rezeptor bindet. Die N-terminale 34-Aminosäuresequenz von PTNRP ist von begrenzter Sequenzhomologie zu der von PTH, aber zeigt in bestimmten Fällen ähnliche Aktivität zu PTH. Jedoch ist PTHRP im allgemeinen weniger wirksam und weniger knochenanabolisch als PTH und ist nicht mit der Bruchheilung verbunden worden. Die Sequenz von hPTHRP (1–34) ist folgende:

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).			

**[0004]** Es ist von mehreren Rumpf-Homologa und -Analoga von PTHRP berichtet worden. Analoga, in denen Aminosäurereste 22 bis 31 von PTHRP (1–34) durch eine amphipathische α-Helix ersetzt werden (US-Patent Nr. 5,589,452 und WO 97/07815) und verwandte Derivate zur Behandlung von Osteoporose sind als nützlich beschrieben worden (B. H. Vickery et al. J. Bone & Mineral Research, 11(12): 1943–1951 (1996); D. Leaffer et al. Endocrinology, 136(8): 3624–3631 (1995)). Es wurde gezeigt, daß monocyclische und bicyclische Analoga von PTHRP (1–34) und PTHRP (7–34) stark an den PTH-Rezeptor binden und die PTH-stimulierte Adenylylat-Cyclase-Aktivität in Osteoblast-ähnlichen Zellen stimulieren (oder antagonisieren). (Michael Chorev et al. Biochemistry, 36: 3293–3299 (1997), und WO 96/40193).

**[0005]** In einem Aspekt stellt diese Erfindung die Verwendung eines Polypeptidanalogons des Nebenschilddrüsenhormon-verwandten Peptids (PTHRP) und Salze davon bereit, wobei die Aminosäurereste 22 bis 31 eine amphipathische α-Helix bilden, die vorzugsweise aus hydrophilen Aminosäuren (Haa) und lipophilen Aminosäuren (Laa) besteht, in der Sequenzreihenfolge:

Haa (Laa Laa Haa Laa)<sub>2</sub> Laa;  
zur Herstellung eines Medikaments zur Knochenheilung und Bruchwiederherstellung.

**[0006]** Wenn illustrative Ausführungsformen dieser amphipathischen Helix in die PTHrP-Sequenz, insbesondere in N-terminale Rümpfe von menschlichem PTHrP eingeführt werden (Reste 1–32 bis 1–38), sind die resultierenden Polypeptide bei der Knochenheilung und Bruchwiederherstellung wirksam. Die systemische Verabreichung ist eine bevorzugte Abgabeweise.

**[0007]** Eine kurze Beschreibung der Zeichnungen wird nachstehend angegeben:

**[0008]** [Fig. 1](#) zeigt die wöchentliche radiographische Dichte eines segmentierten Knochenfehlers in dem Rattenbruchmodell über den Verlauf von fünf Wochen der Behandlung mit PTHrP-Analoga B oder C in bezug auf die Kontrolle. Sie zeigt, daß nach vier Wochen das Knochenwachstum in den Defekten von Tieren, die mit PTHrP-Analoga behandelt wurden, größer war als bei den Kontrolltieren. PTHrP-Analoga B und C sind  $(MAP_{1-10})^{22-31}Ala^{19}hPTHrP(1-34)NH_2$  bzw.  $(MAP_{1-10})^{22-31}His^{26}hPTHrP(1-34)NH_2$ .

**[0009]** [Fig. 2](#) zeigt das radiographische Dichteverhältnis des segmentierten Knochens zu dem kontralateralen Oberschenkelknochen (Kontrolle) in dem segmentierten Defektrattenbruchmodell nach sechs Wochen der Behandlung mit der Kontrolle oder PTHrP-Analoga B oder C. Die Ratten, die mit PTHrP-Analoga B und C behandelt wurden, wiesen eine erhöhte Knochendichte in bezug auf die Ratten, die mit der Kontrolle behandelt wurden, auf.

**[0010]** [Fig. 3](#) zeigt Radiogramme mit hoher Auflösung von Knochendefekten in dem segmentierten Defektrattenbruchmodell von Ratten nach der Behandlung für sechs Wochen mit entweder der Kontrolle (3A) oder PTHrP-Analogen C (3B). Das Radiogramm zeigt, daß der Kontrolldefekt nicht-verwachsen bleibt, während der Defekt, der mit PTHrP-Analogen C behandelt wurde, heilt.

**[0011]** [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) zeigen die Heilung eines intramembranösen Knochenfehlers bei Kaninchen nach der Behandlung mit PTHrP-Analogen D,  $(MAP_{1-10})^{22-31}hPTHrP(1-34)NH_2$ , bei zwei unterschiedlichen Dosierungen.

**[0012]** [Fig. 5](#) zeigt die Verwachsungsrate, erreicht in dem Corticosteroid-induzierten, verzögerten Heilungsbruchmodell mit PTHrP-Analogen D,  $(MAP_{1-10})^{22-31}hPTHrP(1-34)NH_2$ .

**[0013]** Im Folgenden wird eine ausführlichere Beschreibung der Erfindung angegeben.

**[0014]** Die Ein- und Dreibuchstaben-Abkürzungen für die verschiedenen bekannten Nukleotidbasen und Aminosäuren sind so, wie sie in Pure Appl. Chem. 31: 639 – 645 (1972) und 40: 277 – 290 (1974) empfohlen wurden. Die Abkürzungen stellen L-Aminosäuren dar, sofern sie nicht als D oder D, L angegeben werden. Bestimmte Aminosäuren, sowohl natürlich als auch nicht-natürlich, sind achiral, beispielsweise Glycin. Alle Peptidsequenzen werden mit der N-terminalen Aminosäure an der Linken und der C-terminalen Aminosäure an der Rechten dargestellt.

**[0015]** Es wird angenommen, daß sowohl die natürlichen als auch unnatürlichen Aminosäuren in den PTHrP-Analoga, die in dieser Erfindung verwendet werden, vorliegen. Beispiele von unnatürlichen Aminosäuren und ihren Abkürzungen umfassen Homoserin (hSer), Homoserinlacton (hSerlac), Homocystein (Hcy), Homarginin (hArg), Homocitrullin (hCti), Penicillamin (Pen), Na-Methylarginin (N-McArg), Norleucin (Nle), Norvalin (Nval), Norisoleucin (Nlle), N-Methylisoleucin (N-Melle), Phenylglycin (PhG), t-Butylglycin (Tle), Hydroxyprolin (Hyp), 3,4-Dehydroprolin ( $\Delta$ -Pro), Pyroglutamin (Pyr, Glp), Ornithin (Orn), 1-Aminoisobuttersäure (1-Aib), 2-Aminoisobuttersäure (2-Aib), 2-Aminobuttersäure (2-Abu), 4-Aminobuttersäure (4-Abu), 2,4-Diaminoisobuttersäure (A2bu),  $\alpha$ -Aminokorksäure (Asu), Albizzin (Abz),  $\beta$ -Cyclohexylalanin (Cha), 3-(1-Naphthyl)alanin (1-Nal), 3-(2-Naphthyl)alanin (2-Nal), Citrullin (Cit), Pipcolinnsäure (Pip), 4-Chlorphenylalanin (4-CIPhe), 4-Fluorphenylalanin (4-FPhe), Sarcosin (Sar) und 1-Aminopropancarbonsäure (1-NCPC). Sowohl natürliche als auch unnatürliche Aminosäuren sind kommerziell erhältlich von Verkäufern wie NovaBiochem (San Diego, CA, USA) und Bachem (Torrance, CA, USA).

**[0016]** Die PTHrP-Polypeptidanaloga werden in Bezug auf ihre Variation von der natürlichen Sequenz von hPTHrP beschrieben. Die Darstellung  $(MAP_{1-10})$  bezieht sich auf die spezielle nachstehend gezeigte amphipatische Helixsequenz

Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu (SEQ ID Nr.: 2),  
die MAP-Sequenz von zehn Aminosäureresten.

**[0017]** Daher bezieht sich die Sequenz, die als  $(MAP_{1-10})^{22-31}THeP(1-34)$  dargestellt wird, auf die 1–34 N-ter-

minalen Reste von hPThrP mit dem Segment zwischen den Resten 22–31, die durch die MAP-Sequenz ersetzt werden. Innerhalb der MAP-Sequenz können zusätzliche Varianten angegeben werden. Daher bezieht sich (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>His<sup>26</sup>hPThrP(1-34) auf die 1–34 N-terminalen Reste von hPThrP mit dem Segment zwischen den Resten 22–31, die durch eine MAP-Sequenz ersetzt wurden, in der sich Histidin an Position 26 befindet (anstelle von Lysin als die Standard-MAP-Sequenz).

**[0018]** Zusätzliche Varianten aus der natürlich vorkommenden Sequenz werden ebenso angegeben. (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>Pro<sup>32</sup>hPThrP(1-32) bezieht sich auf die 1–32 N-terminalen Reste von hPThrP mit der MAP-Sequenz an den Positionen 22–31 und einem Prolin (welches das natürlich vorkommende Histidin ersetzt) an Position 32. (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>D-Orn<sup>34</sup>lactamhPThrP(1-34) bezieht sich auf die 1–34 N-terminalen Reste von hPThrP mit der MAP-Sequenz an den Positionen 22–31 und einem Ornithin an Position 34 mit einem Lactam, das zwischen der Aminogruppe der Ornithinseitenkette und dem Carboxy-Terminus gebildet wurde. (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>hSer<sup>34</sup>hPThrP(1-34)Thr His Ile Gln NH<sub>2</sub> bezieht sich auf die 1–34 N-terminalen Reste von hPThrP mit der MAP-Sequenz an den Positionen 22–31, einem Homoserin an Position 34, einer zusätzlichen Sequenz Thr His Ile Gln an den Positionen 35–38 und dem Carboxy-Terminus, das ein primäres Amid ist.

**[0019]** Polypeptide mit cyclisierten Verknüpfungen zwischen Aminosäureresten werden mit den zwei vernetzten Resten angegeben, die in den Klammern stehen und durch ein „c“ eingeleitet werden. Im allgemeinen werden die Verknüpfungen zwischen den zwei Resten zwischen den Seitenkettenfunktionalitäten, typischerweise als Amid- oder Esterbindungen, gebildet. Daher bezieht sich (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>-Lacton auf die 1–34 N-terminalen Reste von hPThrP mit dem Segment zwischen den Resten 22–31, ersetzt durch die MAP-Sequenz, die Aminoseitenkette von Lysin an Position 13, cyclisiert mit der Carboxylseitenkette von Aspartat an Position 17 und einem zusätzlichen Homoserin an Position 34 mit einem Lacton, das zwischen der Hydroxylseitenkette des Homoserins und dem Carboxyl-Terminus gebildet wurde. Ebenso bezieht sich (MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>c[Lys<sup>13</sup>,Asp<sup>17</sup>]hPThrP(1-34) auf die 1–34 N-terminalen Reste von hPThrP mit dem Segment zwischen den Resten 22–31, ersetzt durch die MAP-Sequenz und die Aminoseitenkette eines Lysins an Position 13, cyclisiert mit der Carboxylseitenkette eines Aspartats an Position 17.

**[0020]** „Hydrophile Aminosäure (Haa)“ bezieht sich auf eine Aminosäure mit mindestens einer hydrophilen funktionellen Gruppe zusätzlich zu denen, die für die Peptidbindungsbildung benötigt werden, wie Arginin, Asparagin, Aspartinsäure, Glutaminsäure, Glutamin, Histidin, Lysin, Serin, Threonin und ihre Homologa.

**[0021]** „Lipophile Aminosäure (Laa)“ bezieht sich auf eine ungeladene, aliphatische oder aromatische Aminosäure, wie Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Valin und ihre Homologa.

**[0022]** Für die Zwecke dieser Erfindung wird Alanin als „amphiphil“ klassifiziert, d.h. es kann entweder hydrophil oder lipophil agieren.

**[0023]** Ein „Polypeptidanalogon von PTHrP“ bezieht sich auf ein Polypeptid mit in der Technik üblichen Substitutionen, Deletionen oder Insertionen in bezug auf PTHrP oder ist im wesentlichen homolog zu PTHrP, so daß das Analogon eine ähnliche physiologische Aktivität aufweist.

**[0024]** „Physiologisch aktives Rumpf-Analogon von PTHrP“ bezieht sich auf ein Polypeptid mit einer Sequenz, umfassend weniger als das vollständige Komplement an Aminosäuren, die in PTHrP gefunden wurden, was jedoch eine ähnliche physiologische Reaktion bewirkt. Die Rumpf-PTHrP-Analoga müssen nicht vollständig homolog mit PTHrP sein, um eine ähnliche physiologische Reaktion zu bewirken. Typischerweise werden die Rumpf-Analoga von dem C-Terminus abgeschnitten sein und werden zwischen 30 und 40 Resten liegen, wobei PTHrP(1-32), PTHrP(1-34) und PTHrP(1-38) bevorzugte, aber nicht ausschließliche Vertreter dieser Gruppe sind. Im allgemeinen werden die Analoga konservative Substitutionen von Aminosäuren gemäß den in der Technik üblichen Parametern, die nachstehend beschrieben werden, tragen.

**[0025]** Der Ausdruck „im wesentlichen homolog“, wenn er sich auf Polypeptide bezieht, bedeutet, daß das in Frage kommende Polypeptid mindestens etwa 80% Homologie, normalerweise etwa 90% Homologie und vorzugsweise 95% Homologie zu dem betreffenden Polypeptid aufweist. Die Homologie für Polypeptide wird typischerweise unter Verwendung von Sequenzanalysesoftware gemessen. (Siehe beispielsweise Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wisconsin 53705 USA).

**[0026]** „Amphipathische α-Helix“ bezieht sich auf die sekundäre Struktur, die bestimmte Polypeptide zeigen, in denen die Aminosäuren eine α-Helixkonfiguration mit gegenüberliegenden polaren und nicht-polaren Flä-

chen annehmen, die entlang der langen Achse der Helix orientiert sind. Amphipathische Helixsequenzen können durch den Fachmann gestaltet werden. Spezielle amphipathische Helixsequenzen, die zur Verwendung in den Verfahren dieser Erfindung geeignet sind, werden beispielsweise in US-Patent Nr. 5,589,452 oder WO 97/07815 ausführlicher beschrieben.

**[0027]** Die vorliegende Erfindung basiert auf den Ergebnissen, daß bestimmte Analoga von PTHrP, die eine amphipathische  $\alpha$ -Helix an den Positionen 22–31 enthalten, bei der Knochenheilung und Bruchwiederherstellung wirksam sind. Die amphipathische  $\alpha$ -Helix besteht aus hydrophilen Aminosäuren (Haa) und lipophilen Aminosäuren (Laa) in der Sequenzreihenfolge:

Haa (Laa Laa Haa Laa)<sub>2</sub> Laa

**[0028]** Wenn illustrative Ausführungsformen dieser amphipathischen Helix in die PTHrP-Sequenz, insbesondere in N-terminale Rümpfe von menschlichem PTHrP (Reste 1–32 bis 1–38) eingeführt werden, sind die resultierenden Polypeptide bei der Knochenheilung und Bruchwiederherstellung wirksam. Im Gegensatz zu PTH, PTHrP oder Analoga davon ohne dieses amphipathische Helixsegment, verursachen die hierin verwendeten Analoga keine Hyperkalzämie. Außerdem lösen diese Analoga eine schnellere Erhöhung im Knochen in Bezug auf entweder PTH oder PTHrP aus.

**[0029]** Es wird angenommen, daß zusätzlich zum Beinhalten einer amphipathischen Helix zwischen den Positionen 22 und 31 eine Vielzahl von Substitutionen, Deletionen und Insertionen von Aminosäuren in der PTHrP-Sequenz außerhalb dieser Region vorgenommen werden können, während die dreidimensionale Struktur des Polypeptids erhalten wird. Repräsentative Variationen der PTH- und PTHrP-Sequenz, die die physiologische Aktivität der resultierenden Analoga aufrechterhalten, werden in den US-Patenten Nr. 5,599,792, 5,556,940, 5,607,915 und 5,589,452, und WO 91/06564, WO 94/02510, WO 95/1 1697, WO 96/40193 und WO 97/07815 offenbart. Weitere Varianten, die vom Fachmann erwartet werden, um die physiologische Aktivität aufrechtzuerhalten, können nach den in der Technik üblichen Proteinstrukturmodelliertechniken hergestellt werden. Repräsentative Methodiken zum Ableiten solcher Varianten werden unter anderem von I. Ladunga und R. F. Smith, Protein Eng., 3: 187–196 (1997) und von M. J. Thompson und R. A. Goldstein, in Proteins, 1: 28–37 (1996) beschrieben.

**[0030]** Substitutionsvarianten sind die, bei denen mindestens eine Aminosäure in der natürlichen Sequenz entfernt wird und eine andere Aminosäure an ihre Stelle an derselben Position plaziert wird. Die Substitutionen können einzeln sein, wo nur eine Aminosäure ersetzt wird, oder mehrfach, wo zwei oder mehrere Aminosäuren in demselben Molekül ersetzt werden. Es wird im allgemeinen angenommen, daß irgendwelche konservativen Substitutionen gestattet sein werden. Daher wird angenommen, daß ein Analogon, das der Substitution einer hydrophilen Aminosäure durch eine andere hydrophile Aminosäure oder einer hydrophoben Aminosäure durch eine andere hydrophobe Aminosäure entspricht, ähnliche Bruchheilungseigenschaften wie sein Präcursor aufrechterhält. Die Substitutionen umfassen ebenso PTHrP-Analoga, wobei der C-terminale Rest als ein Amid vorliegt. Zusätzliche Substitutionen können basierend auf Aminosäuren, die entweder geladen oder ungeladen sind, vorgenommen werden. Jede von diesen Gruppen kann außerdem in Untergruppen geteilt werden, um die Substitutionen weiter zu erleichtern.

#### Geladene Aminosäuren

Saure Reste: Aspartinsäure, Glutaminsäure, 2-Aminokoksäure  
Basische Reste: Lysin, Arginin, Histidin, Ornithin

#### Nicht-geladene Aminosäuren

Hydrophile Reste: Serin, Threonin, Asparagin, Glutamin, Methionin  
Aliphatische Reste: Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Norleucin, Isoleucin  
Nicht-polare Reste: Cystein, Homocystein, Methionin, Prolin  
Aromatische Reste: Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Histidin

**[0031]** Alternativ können Aminosäuresubstitutionen auf dem Prinzip der Bioisosterie basieren. Solche bioisosterischen Substitutionen minimieren typischerweise irgendwelche störenden Konformationswirkungen, die die statistische Substitution erzeugen kann. Die Technik des Alaninscannings kann verwendet werden, um Positionen zu identifizieren, wo erwartet wird, daß die isosterische Substitution Varianten bereitstellt, die die physiologische Aktivität erhalten. (Siehe beispielsweise K. H. Pearce Jr., M. H. Ultsch, R. F. Kelley, A. M. de Vos und J. A. Wells, Biochemistry, 35 (32): 10300 – 10307 (1996) und B. Li, J. Y. Tom, D. Oare, R. Yen, W. J. Fair-

brother, J. A. Wells and B. C. Cunningham, Science, 2701657 – 1660 (1995)). Repräsentative isosterische Aminosäuren werden in der nachstehenden Tabelle gezeigt:

Aminosäure	isosterische Aminosäure
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

**[0032]** Deletionsvarianten sind die mit ein oder mehreren Aminosäuren in der entfernten natürlichen Aminosäuresequenz. Normalerweise werden die Deletionsvarianten ein oder zwei Aminosäuren, die in einem speziellen Bereich des Moleküls gelöscht wurden, aufweisen. Es ist wahrscheinlich, daß die Deletionen an den Enden der Sequenz, insbesondere dem Carboxy-Terminus durchgeführt werden. Daher weisen, obwohl PTHrP(1–34)-Fragmente bevorzugt sind, die Sequenzen, die an dem Carboxy-Terminus weiter abgeschnitten sind, ebenso Knochenheilungswirkungen auf.

**[0033]** Insertions- oder Additionsvarianten sind die mit der Aminosäure, die direkt angrenzend an eine Aminosäure an einer speziellen Position in der natürlichen Sequenz eingeführt wird. Direkt angrenzend an eine Aminosäure bedeutet gebunden an entweder die  $\alpha$ -Carboxy- oder  $\alpha$ -Aminogruppe der Aminosäure. Additions- oder Insertionsvarianten werden wahrscheinlich ebenso an den Enden der Sequenz, erneut höchstwahrscheinlich an dem Carboxy-Terminus durchgeführt.

**[0034]** Von den oben aufgelisteten Modifikationen für die natürliche Sequenz sind Substitutionen und Carboxy-Terminus-Additionen und Deletionen bevorzugt.

**[0035]** Die Polypeptid-PThrP-Analoga, die zur Bruchheilung nützlich sind, wie hierin beschrieben, werden im allgemeinen teilweise in US-Patent Nr. 5,589,452 und WO 97/07815 beschrieben. Zusätzliche Analoga umfassen die cyclischen Analoga von N-terminalem hPThrP(1–32), hPThrP(1–34) und hPThrP(1–38), enthaltend eine MAP-Sequenz zwischen den Positionen 22 und 31 und gegebenenfalls mit Resten an den Positionen 13 und 17 und/oder 26 und 30, die über ihre Seitenkettenfunktionalitäten verknüpft sind. Es wird vom Fachmann erkannt, daß eine Vielzahl von Substitutionen an den Positionen 13 und 17 durchgeführt werden können, was die Cyclisierung zwischen diesen zwei Positionen ermöglichen würde.

**[0036]** PTHrP-Analoga von irgendeiner Säugerspezies, beispielsweise Mensch, Rind, Schwein oder Kaninchen, können in dieser Erfindung verwendet werden, wobei menschliches PTHrP bevorzugt ist. Ein Fachmann

wird erkennen, daß Substitutions-, Deletions- und Insertionsvarianten der bevorzugten Ausführungsformen, die nachstehend aufgezählt werden, gemäß den oben beschriebenen in der Technik üblichen Prinzipien ebenso innerhalb des Umfangs der Erfindung liegen.

**[0037]** Bevorzugte Ausführungsformen umfassen die Verwendung von hPTHrP(1-34)-Analoga mit einer MAP-Sequenz an den Positionen 22-31, insbesondere die mit einer positiv geladenen Aminosäure an Position 26, beispielsweise Lysin oder Histidin. Spezielle Ausführungsformen innerhalb dieser Klasse sind:

$(MAP_{1-10})^{22-31}hPTHrP(1-34) NH_2$

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

$(MAP_{1-10})^{22-31}His^{26}hPTHrP(1-34) NH_2$

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

**[0038]** Andere bevorzugte Ausführungsformen umfassen die Verwendung von hPTHrP(1-34)-Analoga mit einer MAP-Sequenz an den Positionen 22-31 und enthalten außerdem eine mono- oder bicyclische Substruktur, die durch Cyclisierung zwischen den Seitenkettenfunktionalitäten der Aminosäurereste, insbesondere zwischen den Resten 13 und 17 oder zwischen den Resten 26 und 30 erzeugt wurde. Die Seitenkettenfunktionalitäten sind typischerweise Amino-, Hydroxy- oder Carboxylgruppen und die Cyclisierung findet über die Bildung einer Amid- oder Esterbindung statt. Die Reste mit Aminofunktionalität an der Seitenkette umfassen Lysin und Ornithin. Die Reste mit Carboxytfunktionalität an der Seitenkette umfassen Aspartinsäure und Glutaminsäure. Spezielle Ausführungsformen innerhalb dieser Klasse umfassen:

$(MAP_{1-10})^{22-31}c[Lys^{13},Asp^{17}]hPTHrP(1-34) hSer^{34} lactone$

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) and

$(MAP_{1-10})^{22-31}c[Lys^{13},Asp^{17}]hPTHrP(1-34) NH_2$

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 NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:6).

**[0039]** Andere hPTHrP-Analoga, die in dieser Erfindung nützlich sind, sind die N-terminalen Sequenzen zwischen 30 und 50 Resten, vorzugsweise 1-32, 1-33, 1-34, 1-35, 1-36, 1-37 und 1-38, mit der MAP-Sequenz bei den Resten 22-31 und gegebenenfalls mit ein oder mehreren Substitutionen an Position 5, 13, 17, 19, 26, 30, 32 oder 34. Spezielle Ausführungsformen innerhalb dieser Klasse umfassen:

(MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>Ile<sup>5</sup>hPTHrP(1-34) NH<sub>2</sub>

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

(MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>Ala<sup>19</sup>hPTHrP(1-34) NH<sub>2</sub>

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),

(MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>Pro<sup>32</sup>hPTHrP(1-32) NH<sub>2</sub>

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),

(MAP<sub>1-10</sub>)<sup>22-31</sup>D-Orn<sup>34</sup>lactam hPTHrP (1-34)

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

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

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

(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 IleGln 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).

**[0040]** Im allgemeinen sind alle Polypeptide, die im wesentlichen zu den speziellen Ausführungsformen, die hierin offenbart werden, homolog sind, für die Verwendungen gemäß der Erfindung nützlich. Normalerweise werden die Polypeptide, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, mindestens etwa 50%, vorzugsweise im Überschuß von etwa 80%, und stärker bevorzugt im Überschuß von etwa 90%, am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95% zu den speziellen Ausführungsformen, die hierin offenbart werden, homolog sein. Die Länge der Polypeptidsequenzen, die hinsichtlich der Homologie verglichen wurde, wird im allgemeinen mindestens etwa 20 Aminosäuren, normalerweise mindestens etwa 24 Reste, typischerweise mindestens etwa 30 Reste und vorzugsweise zwischen 32 und 40 Reste betragen.

**[0041]** Die Verbindungen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, können durch Verfahren hergestellt werden, die in US-Patent Nr. 5,589,452 und WO 96/40193 und WO 97/07815 beschrieben werden. Die Verbindungen werden im allgemeinen durch Festphasensynthese, Lösungssynthese oder rekombinante Verfahren hergestellt, die über das Klonen und die Expression eines Gens, das für das Polypeptid von Interesse kodiert, verlaufen, die dem Fachmann alle bekannt sind. Festphasensynthesen sind für Rumpf-PTHrP-Analoga von vierzig oder weniger Aminosäuren bevorzugt. Analoga mit cyclisierten Seitenketten werden im allgemeinen durch Sammeln des vollständig geschützten Polypeptids an dem Harz, Entfernen der Schutzgruppen und Ausführen der Cyclisierung mit einem geeigneten Kopplungsmittel, wie Benzotriazol-1-yl-oxytris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP), noch vor dem Freisetzen des Polypeptids vom Harz herge-

stellt.

**[0042]** Die Verwendung eines Polypeptidanalogons von Nebenschilddrüsenhormon-verwandten Peptid (PTHrP) und Salzen davon zur Herstellung eines Medikaments für die Heilung von Knochenbrüchen und Knochendurchtrennungen, einschließlich sowohl verwachsenen als auch nicht-verwachsenen Brüchen. Solche Brüche umfassen sowohl traumatische als auch osteoporotische Brüche, beispielsweise Brüche der Hüfte, des Oberschenkelknochenhalses, des Faustgelenkes, von Wirbeln, der Wirbelsäule, von Rippen, des Brustbeines, des Kehlkopfes und der Luftröhre, Speiche/Elle, Schienbein, Kniescheibe, Schlüsselbein, Becken, Oberarmknochen, Unterschenkel, Fingern und Zehen, Gesicht und Knöchel. Andere Verwendungen umfassen das Erleichtern der Gelenkversteifung, beispielsweise Fusionen der Wirbelsäule, Knöchel und Fuß, Ellenbogen, Hüfte und Arthrodesen von Hüfte, Knie und Schulter. Die Verwendung der PTHrP-Analoga, wie hierin beschrieben, wird ebenso im Zusammenhang mit Arthroplastikverfahrensweisen (einschließlich Revisionsarthroplastiken) der Hüfte, Knie, Schulter/Ellenbogen usw. angegeben. Die Knochenheilung kann ebenso in anderen Chirurgieeinrichtungen, wie in der Schädel- und Kiefer- und Gesichtschirurgie, Kieferchirurgie und operative Ballenabtragung, verbessert werden. Es ist gezeigt worden, daß die PTHrP-Analoga die Heilung sowohl bei Ersatzknochen (Beispiele 1 und 2), die über die Knorpelkallusbildung verläuft, als auch bei intramembranösen Knochen (Beispiel 3), die keine intermediäre Kallusbildung benötigen, beschleunigen. Die Heilung bei intramembranösen Knochen ist besonders in Fällen bevorzugt, wo die Bruchheilung verzögert ist, beispielsweise bei Diabetikern, Rauchern, Geriatrikern, anämischen Patienten und Patienten, die der Corticosteroid- (insbesondere chronische Glucocorticoide), chronischen NSAID- oder immunsuppressiven Therapie unterliegen.

**[0043]** Die spezielle Dosierung eines PTHrP-Analogon, die notwendig ist, um die Bruchheilung gemäß dieser Erfindung zu erleichtern, wird von der Schwere des Zustandes, der Verabreichungsweise und verwandten Faktoren abhängen, die durch den behandelnden Arzt bestimmt werden. Typischerweise wird die Dosierung zwischen etwa 0,01 und 10 µg/kg Körpergewicht pro Tag, vorzugsweise etwa 0,1 bis etwa 0,5 µg/kg Körpergewicht pro Tag liegen. Für einen menschlichen Patienten mit 50 kg beträgt die tägliche Dosis an Wirkstoff etwa 0,5 bis etwa 100 µg, vorzugsweise etwa 5 bis etwa 10 µg. Diese Dosierung kann in einer konventionellen pharmazeutischen Zusammensetzung durch eine Einzelverabreichung, durch Mehrfachverabreichungen oder mittels kontrollierter Freisetzung nach Bedarf verabreicht werden, um die effektivsten Ergebnisse zu erreichen. Die Dosierung wird fortgesetzt, so lange wie es medizinisch angegeben ist, die in Abhängigkeit der Schwere der Verletzung zwischen wenigen Wochen und mehreren Monaten liegen kann.

**[0044]** Die PTHrP-Analoga können systemisch, beispielsweise oral, parenteral (einschließlich subkutan, intramuskulär und intravenös), rektal, bukkal (einschließlich sublingual), transdermal, pulmonal und intranasal verabreicht werden. Typische Lungen- und Atmungsabgabesysteme werden in US-Patent Nr. 5,607,915 beschrieben. Die nasale Abgabe von PTHrP-Analoga wird in WO 97/07815 beschrieben. Ebenso ist in dieser Erfindung die systemische Verabreichung von PTHrP-Analoga zusammen mit der lokalen Behandlung eines zweiten Knochenheilungsmittels einbezogen. Repräsentative Mittel für eine solche lokale Verabreichung umfassen die morphogenetischen Knochenproteine (BMP-2 und BMP-7), osteogene Proteine (OP-1), Wachstumsfaktoren, wie TGF-β1, und Zytokine, wie IFN-β. Typischerweise werden diese Mittel lokal in verschiedenen Trägern, wie Hydroxyapatit und/oder Calciumcarbonat und Amylopectin, verabreicht. Die systemische Verabreichung von PTHrP-Analoga kann ebenso mit alternativen Verfahren der Bruchheilung, wie mechanische oder biophysikalische Stimulation, beispielsweise elektrisch oder Ultraschall, kombiniert werden.

**[0045]** PTHrP-Analoga werden typischerweise als pharmazeutische Zusammensetzungen in Beimischung mit einem pharmazeutisch akzeptablen, nicht-toxischen Träger verabreicht. Wie oben erwähnt, können diese Zusammensetzungen zur parenteralen (subkutanen, intramuskulären oder intravenösen) Verabreichung, insbesondere in Form von flüssigen Lösungen oder Suspensionen; zur oralen oder bukkalen Verabreichung, insbesondere in Form von Tabletten oder Kapseln; zur intranasalen Verabreichung, insbesondere in Form von Pulvern, Nasentropfen oder Aerosolen; und zur rektalen oder transdermalen Verabreichung hergestellt werden.

**[0046]** Flüssige Formulierungen zur parenteralen Verabreichung können als Bindemittel steriles Wasser oder physiologische Kochsalzlösung, Alkylenglykole, wie Propylenglykol, Polyalkylenglykole, wie Polyethylenglykol, Öle pflanzlichen Ursprungs, hydrierte Naphthaline und dergleichen enthalten. Sie können leicht saure Puffer in pH-Bereichen von etwa 4 bis etwa 6 einsetzen. Geeignete Puffer umfassen Acetat, Ascorbat und Citrat bei Konzentrationen zwischen etwa 5 mM bis etwa 50 mM. Zur oralen Verabreichung kann die Formulierung durch die Zugabe von Gallensalzen oder Acylcarnitinien verbessert werden. Formulierungen zur nasalen Verabreichung können fest sein und können Bindemittel, beispielsweise Laktose oder Dextran, enthalten oder können wässrige oder ölige Lösungen zur Verwendung in Form von Nasentropfen oder Dosierspray sein. Spezielle

nasale Formulierungen umfassen trockene Pulver, die für konventionelle Trockenpulver-Inhalatoren (DPI's) geeignet sind, flüssige Lösungen oder Suspensionen, die zur Versprühung geeignet sind, und Treibmittelformulierungen, die zur Verwendung in Dosieraerosolen (MDI's) geeignet sind. Zur bukkalen Verabreichung umfassen typische Bindemittel Zucker, Calciumstearat, Magnesiumstearat, quellbare Stärke und dergleichen.

**[0047]** Wenn sie zur nasalen Verabreichung formuliert werden, kann die Absorption durch die Nasenschleimhaut durch oberflächenaktive Säuren, wie beispielsweise Glykocholsäure, Cholsäure, Taurocholsäure, Ethocholsäure, Deoxycholsäure, Chenodeoxycholsäure, Dehydrocholsäure, Glykodeoxycholsäure, Cyclodextrine und dergleichen, in einer Menge zwischen etwa 0,2 und 15 Gew.-%, vorzugsweise zwischen etwa 0,5 und 4 Gew.-%, am stärksten bevorzugt etwa 2 Gew.-% verbessert werden.

**[0048]** Die Abgabe der erfindungsgemäßen Verbindungen an den Patienten über einen längeren Zeitraum, beispielsweise für einen Zeitraum von einer Woche bis zu einem Jahr, kann durch eine Einzelverabreichung eines kontrollierten Freisetzungssystems, enthaltend ausreichend Wirkstoff für die gewünschte Freisetzungzeit, erreicht werden. Verschiedene kontrollierte Freisetzungssysteme, wie monolithische oder Mikrokapseln vom Reservoirtyp, Depotimplantate, osmotische Pumpen, Bläschen, Mizellen, Liposome, transdermale Pflaster, Iontophorese-Vorrichtungen und alternative injizierbare Dosierungsformen, können für diesen Zweck verwendet werden. Die Lokalisierung an der Stelle, an der die Abgabe des Wirkstoffes gewünscht ist, ist ein zusätzliches Merkmal von einigen kontrollierten Freisetzungsvorrichtungen, die sich bei der Behandlung von bestimmten Erkrankungen als vorteilhaft erweisen.

#### Beispiele

#### Referenzbeispiele

#### Tablettenformulierung

**[0049]** Die folgenden Inhaltsstoffe werden gründlich gemischt und in einzelne eingeritzte Tabletten gepreßt.

Menge pro Inhaltsstoff	Tablette, mg
Erfindungsgemäße Verbindung	400
Maisstärke	50
Croscarmellose-Natrium	25
Laktose	120
Magnesiumstearat	5

#### Kapselformulierung

**[0050]** Die folgenden Inhaltsstoffe werden gründlich gemischt und in eine Hartschalen-Gelatinekapsel gefüllt.

Menge pro Inhaltsstoff	Kapsel, mg
Erfindungsgemäße Verbindung	200
Laktose, sprühgetrocknet	148
Magnesiumstearat	2

#### Suspensionsformulierung

**[0051]** Die folgenden Inhaltsstoffe wurden gemischt, um eine Suspension zur oralen Verabreichung zu bilden.

Inhaltsstoff	Menge
Erfindungsgemäße Verbindung	1,0 g
Fumarsäure	0,5 g
Natriumchlorid	2,0 g
Methylparaben	0,15 g
Propylparaben	0,05 g
Granulierter Zucker	25,5 g
Sorbitol (70%ige Lösung)	12,85 g
Veegum K (Vanderbilt Co.)	1,0 g
Aromastoff	0,035 ml
Farbstoffe	0,5 mg
Destilliertes Wasser	q.s. auf 100 ml

## Injizierbare Formulierung

**[0052]** Die folgenden Inhaltsstoffe werden gemischt, um eine injizierbare Formulierung zu bilden.

Inhaltsstoff	Menge
Erfindungsgemäße Verbindung	0,2 g
Natriumacetatpufferlösung, 0,4 M	2,0 ml
HCl (1N) oder NaOH (1N)	q.s. für geeigneten pH
Wasser (destilliert, steril)	q.s. auf 20 ml

## Nasale Formulierung

**[0053]** Die folgenden Inhaltsstoffe werden gemischt, um eine Suspension zur nasalen Verabreichung zu bilden.

Inhaltsstoff	Menge
PTHRP-Analogen	20 mg/ml
Zitronensäure	0,2 mg/ml
Natriumcitrat	2,6 mg/ml
Benzalkoniumchlorid	0,2 mg/ml
Sorbitol	35 mg/ml
Natriumaurocholat oder Glykocholat	10 mg/ml

## Beispiel 1

## Heilung von segmentierten Bruchdefekten mit PTHrP-Analoga

**[0054]** Eine Modifikation des segmentierten Oberschenkeldefektrattenmodells wurde verwendet, um zu zeigen, daß PTHrP-Analoga die Knochenheilung und Bruchwiederherstellung erleichtern. (T. A. Einhorn et al. J. Bone Joint, 66274–279 (1984)).

**[0055]** Erwachsene männliche Sprague-Dawley-Ratten, die etwa 300 g wogen, wurden auf Laboratory Rodent Diet 5001 (PM1 Feeds, St. Louis, MO, USA) und Wasser nach Belieben gehalten. Alle Ratten erhielten nur Wasser für 12 Stunden vor dem operativen Eingriff. Die Tiere wurden vor dem operativen Eingriff durch IP-Injektion mit Ketamin (80 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) anästhetisiert. Eine Einzeldosis von Procainpenicillin wurde intramuskulär zur Prophylaxe gegen Infektion verabreicht.

**[0056]** Ein lateraler Zugangsweg an den Oberschenkel wurde verwendet und eine vorgebohrte Polyethylenplatte mit hoher Dichte wurde entlang der vorderen Rinde des Oberschenkels fixiert. Während dieser Plazierung wurde die Knochenhaut des Oberschenkels extensiv abgezogen. Ein 1 mM nicht-kritischer großer segmentaler Defekt wurde in dem Mittelteil des Oberschenkelschafts erzeugt. Die Wunde wurde mit Nylon und Chromnähten geschlossen.

**[0057]** Postoperativ wurden die Ratten in Käfigen plaziert, wobei sie 48 Stunden postoperativen Zugang zu Futterpellets hatten. Die Tiere wurden mindestens einmal täglich beobachtet, und die Tiere, die irgendwelche Anzeichen von Krankheit zeigten, wurden untersucht und die geeignete Therapie verabreicht, wenn notwendig.

**[0058]** Die Ratten wurden in Gruppen geteilt, wie in Tabelle 1 gezeigt, und es wurde entweder ein Kontrollversuch (physiologische Kochsalzlösung) oder ein PTHrP-Analogon, wie hierin beschrieben, subkutan täglich, ausgehend vom postoperativen Tag 1, verabreicht. Radiographische Analysen wurden wöchentlich durchgeführt. Die Tiere wurden nach 6 Wochen getötet und durch Radiographie verglichen.

**[0059]** Sedierte Ratten wurden in die Bauchlage gebracht, wobei sich die Hinterextremitäten nach außen drehen. Reihenradiogramme von jedem Oberschenkel (komplizierter Oberschenkel und kontralateraler Oberschenkel) wurden wöchentlich aufgenommen, ausgehend von der postoperativen Woche 1. Eine Aluminiumphantomvorrichtung mit bekannten Dichtewerten wurde in jedes Radiogramm zur Kalibrierung einbezogen. Jedes Radiogramm wurde auf eine Transluminationsplatte plaziert und ein Bild unter Verwendung einer DCS 420 Digitalkamera von Kodak gemacht. Diese Abbildungen wurden dann zu einem Gateway 2000 IBM kompatiblen Computer übertragen und unter Verwendung von Bildanalysesoftware (Sigma Scan) digitalisiert. Eine Umrißlinie des Defektes wurde gezeichnet und die durchschnittliche Dichte der Fläche der Osteotomie in behandelten Tieren in Bezug auf Kontrolltiere gemessen. [Fig. 1](#) zeigt die Erhöhung der Knochendichte der Osteotomie bei behandelten Tieren in Bezug auf Kontrolltiere bei wöchentlichen Intervallen über die ersten fünf Wochen der Behandlung. Die durchschnittliche Dichte der Osteotomie wurde ebenso mit der durchschnittlichen Dichte des kontralateralen Oberschenkels für jede wöchentliche Ablesung verglichen. [Fig. 2](#) zeigt das radiographische Dichteverhältnis nach sechs Wochen. Der Vergleich dieser Knochendichten zeigte, daß die PTHrP-Analoga eine Knochenheilungswirkung aufwiesen. Nach der Tötung (6 Wochen) wurden die Oberschenkel (experimentell und kontralateral) von dem Weichgewebe getrennt. Feine Körnchenradiogramme wurden von den Oberschenkeln in der lateralen Ebene genommen. Die Osteotomie wurde als verwachsen betrachtet, wenn eine knochenartige Kontinuität des Oberschenkels über mehr als 25% des Querschnittsdurchmessers des Defektes bestand. Der Vergleich von Oberschenkeln von behandelten Tieren zu Kontrolltieren zeigte, daß PTHrP-Analoga die Knochenheilung und Bruchwiederherstellung beschleunigen. [Fig. 3](#) zeigt ein repräsentatives Radiogramm von Kontrolltieren ([Fig. 1A](#)) und behandelten Tieren ([Fig. 1B](#)).

Tabelle 1

Gruppe	Verbindung	Verabreichung	# von Tieren	Tötung
1	Kontrolle	subkutan	10	sechs Wochen
2	PTHrP-Analogon B	subkutan	10	sechs Wochen
3	PTHrP-Analogon C	subkutan	10	sechs Wochen

## Beispiel 2

## Knochenheilung in dem geschlossenen Bruchdefektmodell mit PTNrP-Analoga

**[0060]** Das geschlossene Bruchmodell, das verwendet wurde, ist das Bonnarens/Einhorn-Modell. (F. Bonnarens und T. A. Einhorn, J. Orthopaedic Research, 2: 97–101 (1984)). Die verwendeten Ratten sind wie in Beispiel 1. In diesem Modell wird ein intramedulläres Stäbchen rückläufig durch den distalen Oberschenkel über einen medialen parapatellären Zugang plaziert. Die Arthrotomie wird dann mit nicht-resorbierbaren Nähten geschlossen und das intramedulläre Stäbchen an der Stelle gelassen. Ein geschlossener querer Knochenbruch wird dann durch eine maßgefertigte Dreipunkt-Einspannvorrichtung erzeugt. Die Tiere wurden beobachtet und die radiographische Analyse wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt. PTHrP-Analoga beschleunigten die Knochenheilung und Bruchwiederherstellung in diesem Modell bei behandelten Tieren in Bezug auf Kontrolltiere.

## Beispiel 3

## Intramembranöse Knochenheilung mit PTHrP-Analoga

**[0061]** Kaninchen wurden im allgemeinen anästhetisiert und dem operativen Eingriff unterzogen, um vier Oberflächendefekte zu erzeugen, einen in jedem distalen Oberschenkel und einen in jedem proximalen Schienbein. Ein hinterer lateraler, chirurgischer Einschnitt, der ungefähr 3 cm mißt, wurde durchgeführt, um den distalen, lateral Femurkondylus zu exponieren. Knochen, proximal zum Kniegelenk, wurde subperiosteal exponiert und ein 5-mm-Bohrloch wurde hergestellt, wobei der Bohrkopf durch konstante Spülung kalt gehalten wurde. Die Wunde wurde mit normaler Kochsalzlösung ausgespült. Tiefes Gewebe wurde mit einer laufenden 3-0-Chromnaht geschlossen, gefolgt von der Schließung der subtilären Schicht mit einer laufenden 3-0-Nylonnaht und drei bis vier unterbrochenen Edelstahlnähten. Ein zweiter 3-cm-Einschnitt wurde über dem medialen proximalen Schienbein hergestellt und ein 5-mm-Bohrloch wurde in dem proximalen medialen Schienbein erzeugt. Die Wunde wurde, wie zuvor beschrieben, geschlossen. Die gesamte Verfahrenweise wurde auf den kontralateralen Extremitäten wiederholt.

**[0062]** Stammlösungen von PTNrP-Analogon C, ( $\text{MAP}_{1-10}$ )<sup>22-31</sup>His<sup>26</sup>hPTHrP(1-34)NH<sub>2</sub>, und PTHrP-Analogon D, ( $\text{MAP}_{1-10}$ )<sup>22-31</sup>hPTHrP(1-34)NH<sub>2</sub>, wurden bei 800 µg/ml durch sterile Filtration durch einen 0,22 µm-Filter hergestellt und in Vehikel auf entweder 20 µg/ml oder 100 µg/ml noch vor der Verabreichung verdünnt. Das Vehikel war 30 mg/ml Mannitol, 30 mg/ml Saccharose, 0,12 mg/ml Tween™ 80, 0,17 mg/ml Essigsäure und 2,33 mg/ml Natriumacetattrihydrat. PTHrP-Analoga bei entweder 2 µg/kg/Tag oder 10 µg/kg/Tag wurden täglich durch subkutane Injektion dem chirurgisch behandelten Tier verabreicht.

**[0063]** Die Tiere wurden wöchentlich für die Dauer der Studie geröntgt. Densitometrische Messungen wurden unter Verwendung eines Transilluminationsscanners und MetaMorph™-Software (Universal Imaging, West Chester, PA) durchgeführt. Radiogramme der unteren Extremitäten wurden in Innen- und Außenrotation am postoperativen Tag 10 und 21 durchgeführt. Die Tiere wurden am postoperativen Tag 30 getötet. Am Ende der Studie wurden die Tiere durch eine Pentobarbitalüberdosis eingeschläfert, die Gewebe wurden von den linken und rechten Oberschenkeln entfernt und die Schienbeine wurden durch Röntgen- und histologische Analyse analysiert.

**[0064]** Die Tiere, die mit PTHrP-Analoga C und D behandelt wurden, zeigten beschleunigte intramembranöse Knochenbildung in bezug auf die Vehikel-behandelten Tiere. Die Ergebnisse für PTHrP-Analogon D werden in den [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) für den Oberschenkel bzw. das Schienbein gezeigt. Am Tag 21 gab es keine vollständige Heilung weder in den Oberschenkel- noch den Schienbeindefekten in kontrollbehandelten Tieren, während 40% der Oberschenkel- und Schienbeindefekte in der Niedrigdosisgruppe heilten. Zu diesem Zeitpunkt heilten 75% der Schienbeindefekte und 50% der Oberschenkeldefekte in der Hochdosisgruppe. Bei der Tötung bestätigte die radiographische Analyse der Prüfkörper die Verbesserung der Heilung bei den PTHrP-Analogon-behandelten Tieren mit über 85% der Hochdosisschienbeindefekte, die mit mineralisiertem Gewebe gefüllt waren, während weniger als 10% der Kontrollschienebefehler bei der Tötung gefüllt waren ( $P < 0,01$ ). Ebenso gab es eine signifikant höhere Fülle in den PTHrP-behandelten Oberschenkeldefekten als in den kontrollbehandelten Oberschenkeldefekten ( $p < 0,01$ ).

## Beispiel 4

## Verbesserte Knochenheilung in dem Ellenosteotomiemodell

**[0065]** Der Zweck dieses Experimentes war, zu zeigen, daß PTHrP-Analoga die biomechanische Festigkeit (Teil I) und die Kinetik der Heilung (Teil II) im Rahmen der systemischen Corticosteroidtherapie in einem Kaninchenosteotomiemodell erhöhen können.

**[0066]** Erwachsene männliche weiße New Zealand-Kaninchen wurden in allen Experimenten verwendet. In Teil I wurden zehn Kaninchen in zwei gleiche Gruppen geteilt und in Teil II wurden zwanzig Kaninchen gleich geteilt. Nichtkritische große (1 mm) Defekte wurden bilateral bei jedem Kaninchen erzeugt. Von zwei Monaten vor dem chirurgischen Eingriff bis sechs Wochen postoperativ erhielten alle Kaninchen täglich subkutane Injektionen von entweder Prednison (0,15 mg/kg) in steriles Wasser (experimentelle Gruppe) oder sterile Kochsalzlösung (Kontrollgruppe). Beginnend am ersten postoperativen Tag, wurden der experimentellen Gruppe täglich subkutane Injektionen von PTHrP-Analogon D (0,01 mg/kg) verabreicht, während die Kontrollgruppe Injektionen von normaler Kochsalzlösung erhielt. In Teil I wurden die Tiere nach sechs Wochen nach der Erzeugung der Osteotomie getötet. In Teil II wurden die Tiere getötet, als die radiographische Verwachsung bila-

teral erreicht war, oder in Fällen der Nicht-Verwachsung zehn Wochen postoperativ.

**[0067]** In beiden Experimenten wurden die radiologische Intensität und Heilungsfläche jede weitere Woche analysiert, ausgehend zwei Wochen (Teil I) oder vier Wochen (Teil II) postoperativ. Reihenradiogramme der Vorderextremitäten wurden aufgenommen und digitalisiert und die Knochenfläche wurde unter Verwendung einer Bildanalysesoftware quantifiziert (Sigma Scan Pro). Die Photodensitometrie wurde verwendet, um den Mineralgehalt des neu geformten Knochens an den Stellen der Osteotomie und Kallusbildung zu quantifizieren. Nach der Tötung wurden Faxitronradiogramme mit hoher Auflösung von beiden Extremitäten in den antero-posterioren und lateralen Ebenen aufgenommen, was die Analyse der Bruchkallusdimension und Größe ermöglicht.

#### Ergebnisse – (Teil I)

**[0068]** Neun von zehn PTHrP-Analogon D behandelten Extremitäten erreichten Verwachsung in sechs Wochen, während nur zwei von zehn die Verwachsung in den Vehikel-behandelten Kontrollen erreichten. Diese Ergebnisse werden in [Fig. 5](#) gezeigt. Nach sechs Wochen offenbarten sowohl die anteroposterioren als auch lateralen Faxitron signifikant größere Intensitäten an den Osteotomiestellen der behandelten gegenüber den Kontrollextremitäten. Ebenso war die Intensität von sowohl den proximalen als auch distalen Ellendiaphysen signifikant größer in den behandelten Extremitäten. Lateral war die Intensität der externen Kallusse ebenso bei den behandelten Extremitäten größer. Biomechanisch war die Verdrehfestigkeit der behandelten Extremitäten signifikant größer als die Vehikel-behandelten Kontrollextremitäten in Bezug auf sowohl die Steifheit als auch das maximale Drehmoment.

#### Ergebnisse – (Teil II)

**[0069]** Nach vier Wochen zeigten die behandelten Extremitäten eine größere radiographische Intensität als die Kontrollextremitäten an der Osteotomiestelle ( $p < 0,01$ ) sowie in den externen Knochenkeimgeweben und Ellendiaphysen. Die kombinierten Knochenkeimgewebeblächen der behandelten Extremitäten waren größer ( $p < 0,05$ ) und es gab einen Trend, der zeigt, daß sich die Osteotomiestelle in bezug auf die Größe verringerte. Nach sechs Wochen zeigte die in vivo Radiographie einen Trend der erhöhten Intensität an der Osteotomiestelle der behandelten Extremitäten im Vergleich zu den Kontrollextremitäten, obwohl keine Unterschiede in der Knochenkeimgewebeintensität oder -fläche beobachtet wurde. Radiographisch wurden alle PTHrP-Analogon-behandelten Extremitäten als verwachsen behandelt und all diese Tiere wurden nach sechs Wochen getötet. Nach acht Wochen erreichten vier zusätzliche Extremitäten (zwei Tiere) radiographische Verwachsung und wurden getötet. Nach zehn Wochen wurden die übrigen Tiere getötet, da diese Extremitäten keine radiographische Progression in bezug auf die Heilung gegenüber dem vorhergehenden Zeitraum von vier Wochen zeigten, und wurden daher als Nicht-Verwachsungen klassifiziert. Die PTHrP-Analogon-behandelten Extremitäten zeigten eine größere radiographische Intensität an der Osteotomiestelle ( $p < 0,05$ ) sowie die Ellendiaphyse und die Knochenkeimgewebefläche. Die Fläche der Osteotomie war signifikant kleiner in den PTHrP-Analogon-behandelten Extremitäten als in den Vehikelkontrollextremitäten. Daher führte in diesem Corticosteroid-induziertem Modell der verzögerten Heilung die PTHrP-Analogon-Behandlung zu einer vollständigen Verwachsungsrate nach sechs Wochen, während 75% der nicht-behandelten Extremitäten keine Tendenz der Verwachsung nach zehn Wochen zeigten.

#### Patentansprüche

1. Verwendung eines Polypeptidanalogons von Parathyroidhormon-verwandtem Peptid (PTHrP) und Salzen hiervon, wobei das Analogon ein N-terminaler Rumpf von 30 bis 50 Aminosäureresten ist, worin die Aminosäurereste 22 bis 31 des PTHrP-Analogous eine amphipathische  $\alpha$ -Helix bilden, zur Herstellung eines Medikaments zur Knochenheilung und Bruchwiederherstellung, wobei die amphipatische  $\alpha$ -Helix Glu Leu Leu Glu Xaa Leu Leu Glu Lys Leu ist und Xaa ein positiv geladener Aminosäurerest ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das PTHrP-Analogon durch nasale Abgabe verabreicht wird.
3. Verwendung nach Anspruch 1, ferner umfassend die lokale Verabreichung eines zweiten Knochenheilungsmittels an den Bruch.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der Bruch am intramembranösen Knochen vorliegt.

5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das PTHrP-Analogon systemisch verabreicht wird.
6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei Xaa Lysin oder Histidin ist.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei das PTHrP-Analogon:

**Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser IleGln Asp Leu  
Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH<sub>2</sub>,  
(SEQ ID NO:3) oder**

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

ist.

8. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das PTHrP-Analogon zumindest zwei Aminosäurereste umfaßt, die mittels ihrer Seitenketten miteinander verbunden sind.

9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei die verknüpften Aminosäurereste an den Positionen 13 und 17 oder an den Positionen 26 und 30 vorliegen.

10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei der Aminosäurerest an Position 17 eine Asparaginsäure ist.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die PTHrP-Analoga:

**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 hSerIac (SEQ  
ID NO:5) oder**

**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:6).**

sind.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das PTHrP-Analogon ein N-terminaler Rumpf von 30 bis 50 Aminosäureresten ist, gegebenenfalls substituiert an den Positionen 5, 13, 17, 19, 26, 30, 32 und/oder 34.

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei das PTHrP-Analogon:

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

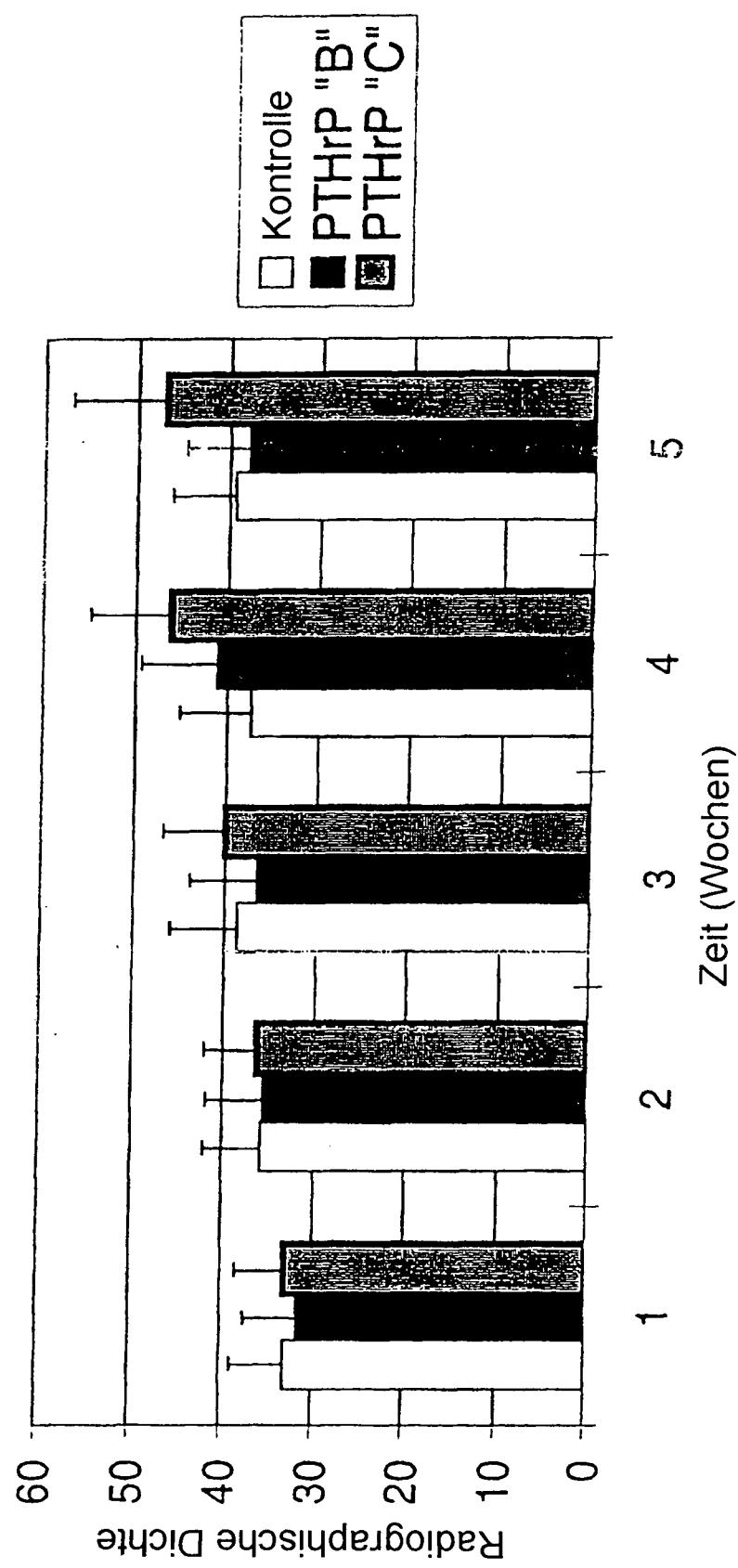
Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser IleGln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr hSer lactam(SEQ ID NO:11) oder

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

ist.

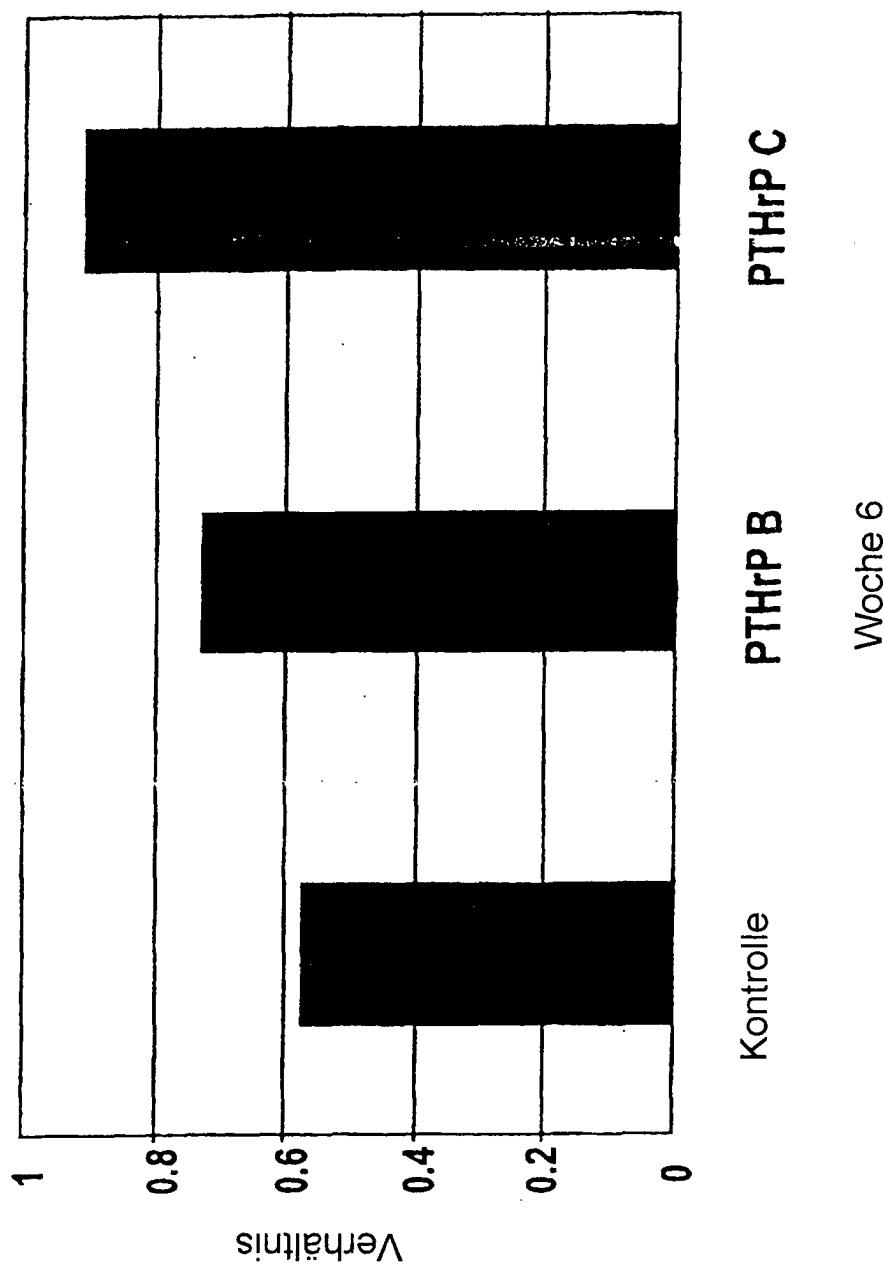
Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Figur 1

**PTHrP Studie - Defekt**

Figur 2

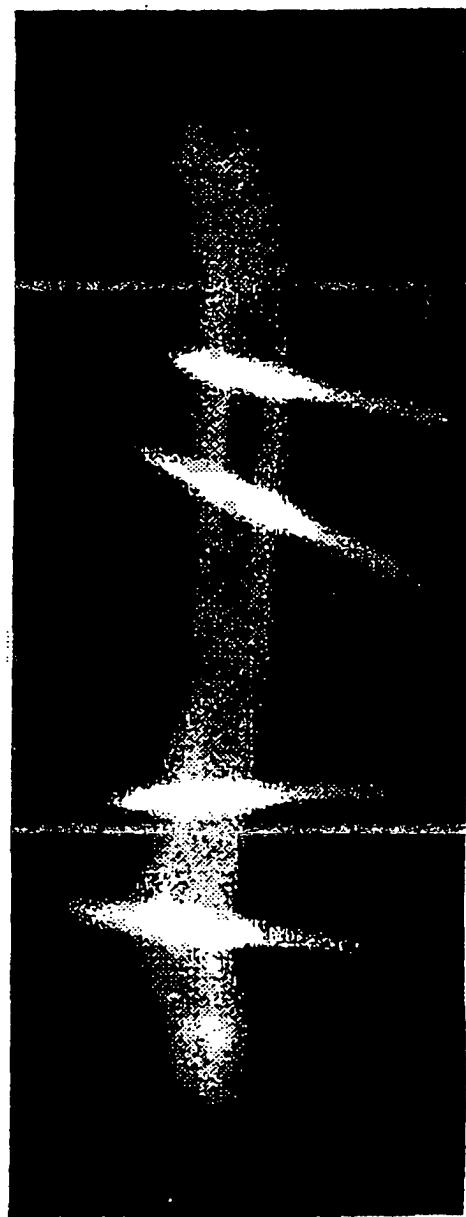
Radiographisches Dichteverhältnis - Defekt/Kontralateral



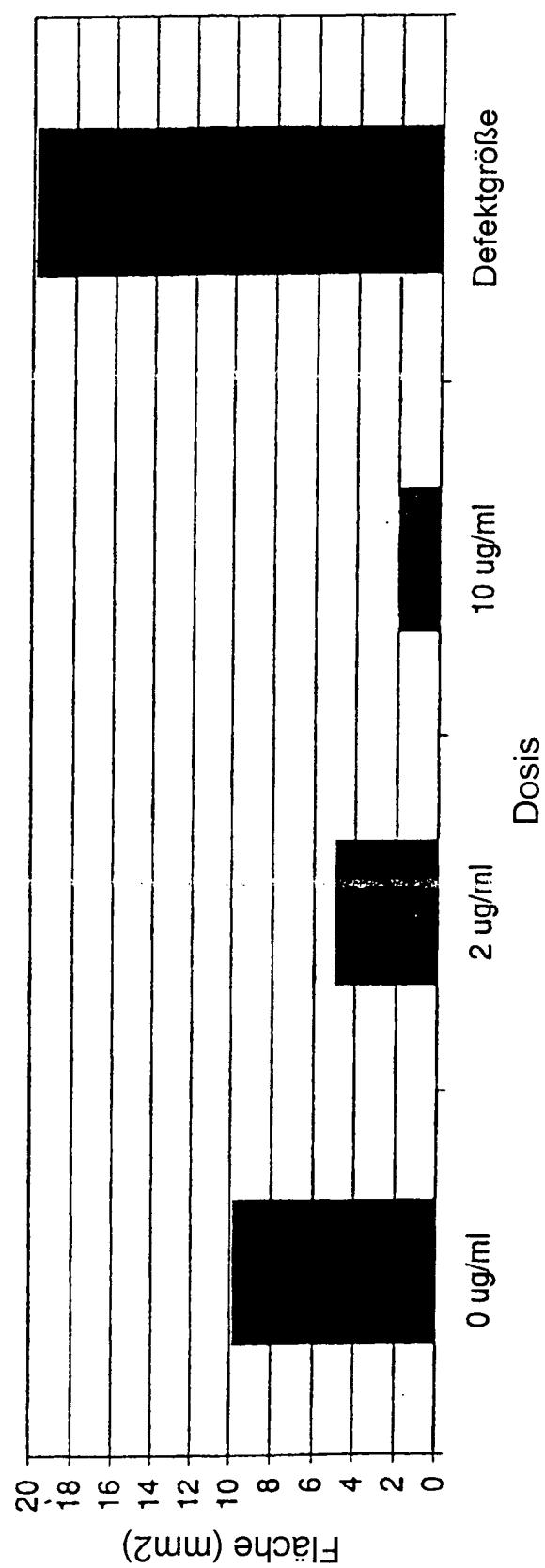
Figur 3A Beispiel eines Radiogramms hoher Auflösung des nicht-verwachsenen Defekts nach 6 Wochen



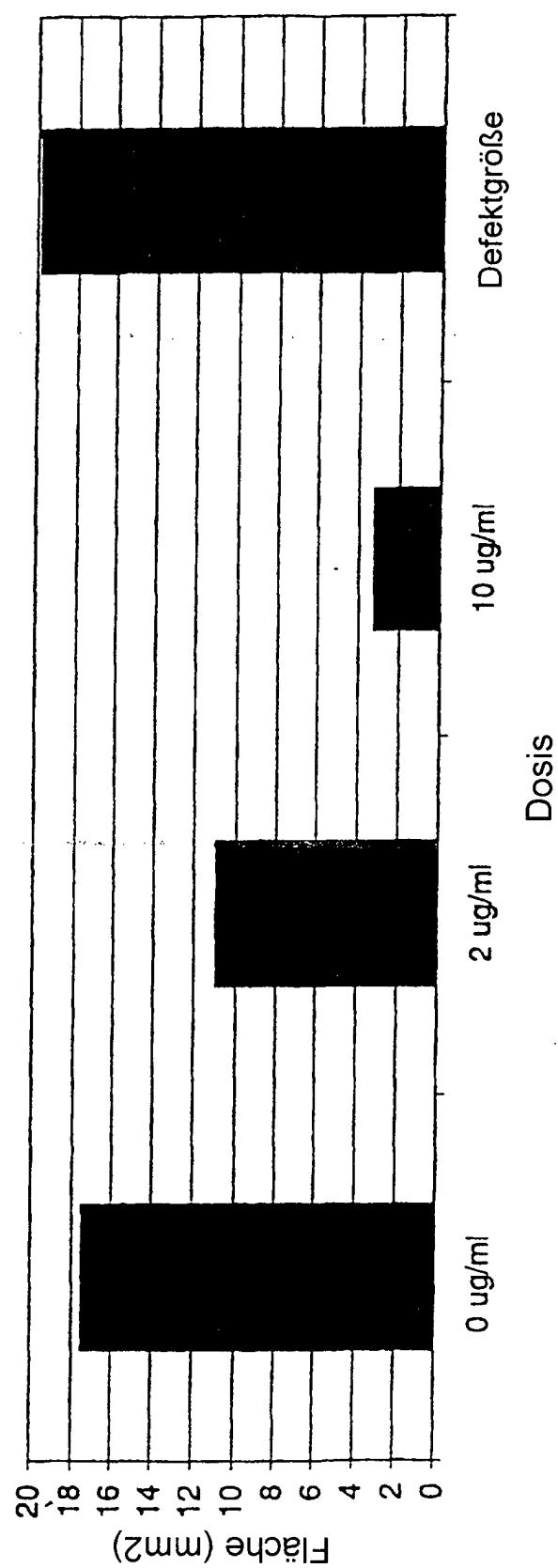
Figur 3B Beispiel eines Radiogramms hoher Auflösung eines geheilten Defekts nach 6 Wochen



Figur 4A Trabekelknochen des Oberschenkels



Figur 4B Kortexknochen des Schienbeins



Figur 5 Verwachsungsrate nach 6 Wochen

