(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 26 517 T2** 2004.03.25

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 835 262 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 26 517.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/08490**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 921 256.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/040775**
(86) PCT-Anmeldetag: **03.06.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **19.12.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.04.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **05.03.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.03.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 14/635**
A61K 38/29

(30) Unionspriorität:
477022 **07.06.1995** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Roche Palo Alto LLC, Palo Alto, Calif., US

(72) Erfinder:
VICKERY, H., Brian, Mountain View, US

(74) Vertreter:
Barz, P., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 80803 München

(54) Bezeichnung: **METHODE ZUR BEHANDLUNG DER CORTICOSTEROID-INDUZIERTEN ORTEOPENIE**

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 eingelegt, 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

Hintergrund der Erfindung

a) Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung eines synthetischen Polypeptidanalogen von Parathyroidhormon (PTH), Parathyroidhormon-verwandtem Peptid (PTHrp) oder eines physiologisch aktiven, verkürzten Homologen oder Analogen von PTH oder PTHrp oder eines Salzes davon, in welchem die Aminosäurereste (22-31) eine amphipathische α-Helix bilden, wobei die Reste (22-31) aus hydrophilen Aminosäuren (Haa) und lipophilen Aminosäuren (Laa) ausgewählt sind, die in der Reihenfolge

$Haa(Laa\ Laa\ Haa\ Haa)_2Laa$

angeordnet sind, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Corticosteroid-induzierter Osteopenie.

b) Beschreibung des Stands der Technik

[0002] Osteoporose stellt die häufigste Form einer Stoffwechsel-Knochenkrankheit dar. Sie lässt sich als symptomatisches Brüchigkeitsstadium des Knochenverlustes (Osteopenie) ansehen. Obgleich Osteoporose sekundär bei einer Anzahl von zugrunde liegenden Krankheiten auftreten kann, sind anscheinend 90% aller Fälle idiopathisch. Frauen nach der Postmenopause unterliegen besonders der Gefahr einer idiopathischen Osteoporose (postmenopausale oder Typ I-Osteoporose). Eine weitere Gruppe mit hohem Risiko einer idiopathischen Osteoporose sind ältere Personen beiderlei Geschlechts (senile oder Typ II-Osteoporose). Osteoporose steht auch im Zusammenhang mit der Verwendung von Corticosteroiden, einer Immobilisierung oder längeren Bettlägerigkeit, Alkoholismus, Diabetes, gonadotoxischer Chemotherapie, Hyperprolactinämie, Anorexia nervosa, primärer und sekundärer Amenorrhoe und Oophorektomie.

[0003] Bei den verschiedenen Formen von Osteoporose treten häufig Knochenbrüche auf, die das Ergebnis von Knochenverlust sind, der ein Ausmaß erreicht hat, bei dem es häufig zu einem mechanischen Versagen kommt. Für die postmenopausale Osteoporose sind Brüche von Handgelenk und Wirbelsäule charakteristisch, während Oberschenkelhalsbrüche bei der senilen Osteoporose überwiegen.

[0004] Bezüglich des Mechanismus, gemäß dem Knochenmasse bei Osteoporose-Patienten verloren geht, nimmt man an, dass ein Ungleichgewicht beim Vorgang der Skeletterneuerung selbst beteiligt ist. Dieser Vorgang wird als Knochenneubildung bezeichnet. Er läuft in einer Reihe von einzelnen Aktivitätstaschen ab. Diese Taschen treten spontan innerhalb der Knochenmatrix an einer gegebenen Knochenoberfläche als Orte der Knochenresorption auf. Osteoklasten (knochenauflösende oder resorbierende Zellen) sind für die Resorption eines Knochenbereiches von im allgemeinen konstanter Dimension verantwortlich. Diesem Resorptionsvorgang folgt das Auftreten von Osteoklasten (knochenbildende Zellen), die neue Knochenmasse in den von den Osteoklasten zurückgelassenen Hohlraum füllen.

[0005] Bei einer gesunden erwachsenen Person liegt die Geschwindigkeit, in der Osteoklasten und Osteoblasten gebildet werden, bei dieser Knochenbildung und Knochenresorption im Gleichgewicht. Jedoch entwickelt sich bei Osteoporose-Patienten ein Ungleichgewicht im Vorgang der Knochenneubildung, was dazu führt, dass der Knochenverlust schneller erfolgt als die Knochenbildung. Obgleich dieses Ungleichgewicht in gewissem Umfang mit zunehmendem Alter bei den meisten Personen auftritt, ist es bei postmenopausalen Osteoporose-Patienten oder im Anschluss an Oophorektemie wesentlich schwerwiegender und erfolgt in einem früheren Altersstadium.

[0006] Adachi et al. berichten in Seminars in Arthritis and Rheumatism, Bd. 22 (6) (Juni 1993), S. 375-384, dass trotz der stark widersprüchlichen Daten bezüglich der Pathophysiologie von Corticosteroid-induzierter Osteoporose nach im allgemeinen übereinstimmender Auffassung eine relative Verringerung der Knochenbildung und eine relative Zunahme der Knochenresorption vorliegen. Knochenverlust mit daraus resultierenden Brüchen und Osteonekrose ist eine häufige Folge der Corticosteroid-Therapie. Es gibt Anzeichen dafür, dass der Knochenverlust innerhalb der ersten 6 bis 12 Monate einer Corticosteroid-Therapie rasch erfolgt. Anscheinend gibt es auch einen engen Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit des Knochenverlustes und der Corticosteroid-Dosis. Männer sind gegenüber den Einflüssen von Corticosteroiden gleichermaßen empfindlich. Das geschätzte Auftreten von Brüchen und Osteonekrose beträgt 30 bis 50%.

[0007] Es gab zahlreiche Versuche zur Behandlung von Osteoporose mit dem Ziel, entweder den weiteren Knochenverlust zu verlangsamen oder, was noch wünschenswerter ist, eine Nettozunahme der Knochenmasse zu erzielen. Bestimmte Mittel, wie Östrogen und Bisphosphonate führen anscheinend zu einer Verlangsamung des weiteren Knochenverlustes bei Osteoporose-Patienten. Mittel, die den Knochenverlust aufgrund der

unterschiedlichen Dauer von Knochenresorption und Knochenbildung verlangsamen, führen anscheinend zu einer Zunahme der Knochenmasse (in der Größenordnung von 3 bis 7%). Jedoch ist diese Zunahme zeitlich begrenzt, nicht progressiv und auf eine Verringerung des "Remodellierungsraums" zurückzuführen. Ferner führen aufgrund der engen Kopplung zwischen Resorption und Neubildung Behandlungen, die die Knochenresorption hemmen, letztlich auch zur Hemmung der Knochenbildung.

[0008] Es wurde die Auffassung vertreten, dass eine Behandlung mit Parathyroidhormon (PTH) zu einem erhöhten Knochen-Turnover und zu einer positiven Calciumbilanz führen könnte. Jedoch haben klinische Untersuchungen beim Menschen gezeigt, dass jegliche Zunahme der trabekulären Knochenmasse zu einer Abnahme der kortikalen Knochenmasse führt, so dass es zu keiner Nettozunahme der Gesamtknochenmasse kommt.

[0009] Hefti et al. berichtet in Clinical Science, Bd. 62 (1982), S. 389-396, dass tägliche subkutane Dosen von bPTH(1-84) oder hPTH(1-34) das gesamte Calcium im Körper und das Aschegewicht von einzelnen Knochen sowohl bei normalen als auch bei osteoporotischen, ausgewachsenen, weiblichen Ratten erhöhte.

[0010] Liu et al. (J. Bone, Miner. Res., Bd. 6 (10) (1991), S. 1071-1080, haben festgestellt, dass eine Ovariektomie bei ausgewachsenen weiblichen Ratten einen 47%igen Verlust der prozentualen trabekulären Knochenmasse in der proximalen tibialen Metaphyse herbeiführte, begleitet von einer erheblichen Zunahme der Anzahl an Osteoblasten und trabekulären Osteoklasten. Tägliche subkutane Injektionen von hPTH(1-34) führten zu einer vollständigen Umkehr des Verlustes der trabekulären Knochenmasse und zu Mengen an trabekulärer Knochenmasse, die die Mengen bei einer Scheinoperation unterzogenen Kontrolltieren überstieg. Die Anzahl an Osteoblasten nahm zu, während die Anzahl an Osteoklasten abnahm.

[0011] Hock et al. (J. Bone Min. Res., Bd. 7 (1) (1992), S. 65-71) berichten, dass tägliche subkutane Injektionen von hPTH(1-34) an gesunde, ausgewachsene männliche Ratten für 12 Tage zu einer Zunahme des trabekulären und kortikalen Knochencalciums und des Trockengewichts führten. Die gesamte Knochenmasse, das trabekuläre Knochenvolumen, die Dicke und die Anzahl der Trabeculae und osteoblastischen Oberflächen nahmen zu.

[0012] Säugetier-Parathyroidhormone, z. B. vom Menschen (hPTH), vom Rind (bPTH) und vom Schwein (pPTH) sind Polypeptid-Einzelketten mit 84 Aminosäureresten und Molekulargewichten von etwa 9 500. Die biologische Aktivität ist mit dem N-terminalen Bereich verbunden, wobei offensichtlich als Minimum die Reste (1-34) erforderlich sind.

[0013] Das N-terminale Segment von humanem PTH unterscheidet sich vom N-terminalen Segment der Rinder- und Schweinehormone nur durch 3 bzw. 2 Aminosäurereste:

hPTH(1-34):

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Asn Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp
20 25 30
Val His Asn Phe (SEQ ID NO:1);

bPTH(1-34):

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp
20 25 30
Val His Asn Phe (SEQ ID NO:2);

pPTH(1-34):

Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Leu Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp
20 25 30
Val His Asn Phe (SEQ ID NO:3).

[0014] Die primäre Funktion von PTH besteht darin, adaptive Veränderungen anzuregen, die zur Aufrechterhaltung einer konstanten Ca^{2+}-Konzentration in der extrazellulären Flüssigkeit dienen. PTH bewirkt in den Nieren eine Zunahme der tubulären Reabsorption von Ca^{2+} aus dem Urin, sowie eine Stimulation der Umwandlung von Calcifediol in Calcitriol, das für die Absorption von Ca^{2+} aus dem Darm verantwortlich ist. Eine wichtige Wirkung besteht in der Förderung der Mobilisierung von Ca^{2+} aus dem Knochen. PTH bewirkt im Knochen eine Zunahme der Resorptionsgeschwindigkeit von Ca^{2+} und Phosphat. PTH stimuliert die Knochenresorptionsgeschwindigkeit durch Osteoklasten, erhöht die Geschwindigkeit der Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoklasten und verlängert die Halbwertszeit dieser letztgenannten Zellen. Bei längerer Wirkung von PTH nimmt auch die Anzahl an knochenbildenden Osteoblasten zu, so dass die Geschwindigkeit des Knochen-Turnovers erhöht und die Neubildung verstärkt werden. Jedoch scheinen individuelle Osteoblasten eine unter dem Normalwert liegende Aktivität aufzuweisen.

[0015] Rosenblatt et al. (US-Patente 4 423 037, 4 968 669 und 5 001 223) beschreiben PTH-Antagonisten, die durch Deletion der N-terminalen (1-6) Aminosäuren und selektiven Ersatz von Phe^{7}, $Met^{8,18}$ und Gly^{12} erhalten wurden. Tyr^{34}-NH2 soll die Aktivität und Stabilität dieser Verbindungen erhöhen.

[0016] Das mit Parathyroidhormon verwandte Peptid (PTHrp), ein Protein mit (140+)-Aminosäuren sowie Fragmente davon reproduzieren die hauptsächlichen biologischen Wirkungen von PTH. PTHrp wird von einer Anzahl von Tumoren und anderen Geweben von Menschen und Tieren entwickelt und spielt möglicherweise eine Rolle bei der Hyperkalzämie bei malignen Zuständen. Nachstehend wird die Sequenz von hPTHrp(1-34) angegeben:

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:4).

[0017] Die Sequenzhomologie zwischen hPTH und hPTNrp ist weitgehend auf die 13 N-terminalen Reste beschränkt, von denen 8 identisch sind. Nur 1 von 10 Aminosäuren in der Rezeptorbindungsregion (25-34) von hPTH ist in hPTHrp konserviert. Eine Konformationsähnlichkeit kann der gemeinsamen Aktivität zugrunde liegen. Cohen et al. (J. Biol. Chem., Bd. 266 (3) (1991), S. 1997-2004, haben darauf hingewiesen, dass ein Grossteil der Sequenz von PTH(1-34) und PTHrp(1-34) (in den speziellen Regionen (5-18) und (21-34)) eine α-helikale Konfiguration annimmt, wobei sie feststellen, dass es fraglich ist, ob diese Konfiguration für das carboxylterminale Ende unter physiologischen Bedingungen vorherrscht. Eine derartige sekundäre Struktur kann für Lipid-Wechselwirkungen, Rezeptor-Wechselwirkungen und/oder strukturelle Stabilisierungen von Bedeutung sein.

[0018] Wir haben Analoge von PTH und PTHrp mit dem Ziel synthetisiert, verbesserte therapeutische Mittel zur Wiederherstellung der Knochenmasse bei Säugern, einschließlich der von Osteoporose betroffenen Säuger, zu entwickeln.

[0019] Die Druckschriften WO-A-94/01460 (Syntex U.S.A. Inc.) und WO-A-95/02610 (Syntex U.S.A. Inc.) betreffen erfindungsgemäße synthetische Polypeptide. Die Verwendung dieser Polypeptide zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Corticosteroid-induzierter Osteopenie wird in diesen Druckschriften weder beschrieben noch nahegelegt.

Zusammenfassende Darstellung der Erfindung

[0020] Die Erfindung betrifft die Verwendung eines synthetischen Polypeptidanalogen von Parathyroidhormon (PTH), Parathyroidhormon-verwandtem Peptid (PTHrp) oder eines physiologisch aktiven, verkürzten Ho-

mologen oder Analogen von PTH oder PTHrp, oder eines Salzes davon, in welchem die Aminosäurereste (22-31) eine amphipathische α-Helix bilden, wobei diese Reste (22-31) aus hydrophilen Aminosäuren (Haa) und lipophilen Aminosäuren (Laa) ausgewählt sind, die in der Reihenfolge

$Haa(Laa\ Laa\ Haa\ Haa)_2Laa$

angeordnet sind, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Corticosteroid-induzierter Osteopenie.

[0021] Gemäß einer Ausführungsform wird die Sequenz der Aminosäurereste (22-31) ausgewählt unter (SEQ ID NO: 85, 86, 26, 27, 28, 29 und 30). Die wirksame Menge des Polypeptids beträgt etwa 0,002 μg Polypeptid/kg Körpermasse des Patienten pro Tag bis etwa 10 μg Polypeptid/kg Körpermasse des Patienten pro Tag.

[0022] Ferner werden pharmazeutische Zusammensetzungen zur Prophylaxe oder Therapie von Corticosteroid-induzierter Osteopenie bereitgestellt, die eine wirksame Menge eines synthetischen Polypeptidanalogen von Parathyroidhormon (PTH), Parathyroidhormon-verwandtem Peptid (PTHrp) oder eines physiologisch aktiven, verkürzten Homologen oder Analogen von PTH oder PTHrp oder eines Salzes davon enthalten, in welchem die Aminosäurereste (22-31) eine amphipathische α-Helix bilden, wobei diese Reste (22-31) aus hydrophilen Aminosäuren (Haa) und lipophilen Aminosäuren (Laa) ausgewählt sind, die in der Reihenfolge

$Haa\ (Laa\ Laa\ Haa\ Haa)_2\ Laa$

angeordnet sind,
und einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthalten.

[0023] Gemäß einer Ausführungsform werden die pharmazeutischen Zusammensetzungen in einer Dosiseinheitsform zur Behandlung von Corticosteroid-induzierter Osteopenie bereitgestellt, wobei die Dosiseinheitsform etwa 1 μg bis etwa 1 000 μg des synthetischen Polypeptidanalogen von Parathyroidhormon (PTH), Parathyroidhormon-verwandtem Peptid (PTHrp) oder eines physiologisch aktiven, verkürzten Homologen oder Analogen von PTH oder PTHrp oder eines Salzes davon, in welchen die Aminosäurereste (22-31) eine amphipathische α-Helix bilden, wobei diese Reste (22-31) aus hydrophilen Aminosäuren (Haa) und lipophilen Aminosäuren (Laa) ausgewählt sind, die in der Reihenfolge

$Haa\ (Laa\ Laa\ Haa\ Haa)_2\ Laa$

angeordnet sind,
und einen pharmazeutisch verträglichen Träger enthalten.

[0024] Wenn spezielle beispielhafte Ausführungsformen dieser Sequenz in PTH, PTHrp und die physiologisch aktiven, verkürzten Analogen und Homologen von PTH und PTHrp eingeführt werden, stellen die erhaltenen Polypeptide wirksame Mittel der Knochenumbildung dar.

[0025] Gemäß einem Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zur Behandlung von Corticosteroid-induzierter Osteopenie mit Analogen von PTH, PTHrp und den physiologisch aktiven, verkürzten Analogen und Homologen von PTH und PTHrp oder Salzen davon bereit, worin die Aminosäurereste (22-31) eine amphipathische α-Helix bilden, wobei die Sequenz der Reste (22-31) ausgewählt ist unter:

a) $Xaa^1\ Xaa^2\ Leu\ Xaa^4\ Xaa^5\ Leu\ Xaa^7\ Xaa^8\ Xaa^9\ Xaa^{10}$
1 5 10

worin Xaa^1 und Xaa^4 unabhängig voneinander Glu, $Glu(OCH_3)$, His oder Phe bedeuten; Xaa^2 Leu oder Phe bedeuten; Xaa^7 und Xaa^{10} unabhängig voneinander Leu oder Ile bedeuten; Xaa^8 Ala, Arg oder Glu bedeutet; und Xaa^9 Lys oder Glu bedeutet (SEQ ID NO: (85 vorzugsweise

Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Xaa Lys Leu
1 5 10

Xaa ist Glu oder Arg (SEQ ID NO: 26);

b) $Xaa^1\ Xaa^2\ Leu\ Xaa^4\ Arg\ Leu\ Leu\ Xaa^8\ Arg\ Leu$
1 5 10

worin Xaa^1 und Xaa^4 unabhängig voneinander Glu, $Glu(OCH_3)$, His oder Phe bedeuten; Xaa^2 Leu oder Phe bedeutet; Xaa^8 Glu, Lys oder $Lys(COCH_2PEGX)$ bedeutet; und PEGX einen Poly-(ethylenglykolmethylether)-Rest mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10 000 bedeutet (SEQ ID NO: 86); vorzugsweise

Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Xaa Arg Leu
1 5 10

worin Xaa Glu, Lys oder Lys($COCH_2$PEGX) bedeutet und PEGX einen Poly-(ethylenglykolmethylether)-Rest mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10 000 bedeutet (SEQ ID NO: 27);

c) Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu (SEQ ID NO: 28);
1 5 10

d) Ser Leu Leu Ser Ser Leu Leu Ser Ser Leu (SEQ ID NO: 29);
1 5 10

e) Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu (SEQ ID NO: 30).
1 5 10

[0026] Gemäß einem weiteren Aspekt werden erfindungsgemäß pharmazeutische Zusammensetzungen mit Analogen von PTH, PTHrp und physiologisch aktiven, verkürzten Homologen und Analogen von PTH und PTHrp oder Salzen davon bereitgestellt, worin die Aminosäurereste (22-31) eine amphipathische α-Helix bilden, wobei die Sequenz dieser Reste (22-31) ausgewählt ist unter:

a) Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Xaa Lys Leu
1 5 10

worin Xaa Glu oder Arg bedeutet (SEQ ID NO: 26);

b) Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Xaa Arg Leu
1 5 10

worin Xaa Glu, Lys oder Lys($COCH_2$PEGX) bedeutet und PEGX einen Poly-(ethylenglykolmethylether)-Rest mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10 000 bedeutet (SEQ ID NO: 27);

c) Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu (SEQ ID NO: 28);
1 5 10

d) Ser Leu Leu Ser Ser Leu Leu Ser Ser Leu (SEQ ID NO: 29);
1 5 10

e) Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu (SEQ ID NO: 30).
1 5 10

[0027] Ferner werden Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen bereitgestellt, die das Vermischen der vorstehend. beschriebenen Verbindungen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0028] **Fig.** 1 zeigt die DNA-Sequenz und die Enzym-Restriktionsstellen eines synthetischen Gens, das für ein PTHrp(1-34)-Analoges der Erfindung kodiert.
[0029] **Fig.** 2 erläutert die Herstellung eines Plasmids, das ein Gen eines PTHrp(1-34)-Analogen enthält.
[0030] **Fig.** 3 erläutert die Herstellung eines Plasmids, das zwei Kopien eines Gens eines PTHrp(1-34)-Analogen enthält.
[0031] **Fig.** 4 erläutert die Herstellung eines Plasmids, das vier Kopien eines Gens eines PTHrp(1-34)-Analogen enthält.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung Abkürzungen und Definitionen

[0032] Die Abkürzungen mit einem bzw. drei Buchstaben für die verschiedenen üblichen Nucleotidbasen und Aminosäuren entsprechen den Empfehlungen in Pure Appl. Chem., Bd. 31 (1972), S. 639-645 und Bd. 40 (1974), S. 277-290 (IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission). Es handelt sich um folgende Abkürzungen mit einem bzw. drei Buchstaben:

Abkürzungen für Aminosäuren

Aminosäure	Symbol mit drei Buchstaben	Symbol mit einem Buchstaben
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Asn + Asp	Asx	B
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Gln + Glu	Glx	Z
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
andere Aminosäuren	Xaa	X

[0033] Die Abkürzungen beziehen sich auf L-Aminosäuren, sofern sie nicht anderweitig als D- oder D,L-Aminosäuren bezeichnet sind. Bestimmte Aminosäuren, und zwar sowohl natürliche als auch künstliche, sind achiral, z. B. Glycin. Sämtliche Peptidsequenzen werden so dargestellt, dass sich die N-terminale Aminosäure auf der linken Seite und die C-terminale Aminosäure auf der rechten Seite befindet. Für andere Aminosäuren und Verbindungen werden die folgenden weiteren Abkürzungen verwendet:

hSer	Homoserin
hSerlac	Homoserin-lacton
Nle	Norleucin
PEG2	Rest von Diethylenglykolmethylether, a.k.a. Methoxydi-(ethylenoxy), $CH_3O(CH_2CH_2O)_2$-, (MG = 119)
PEG5000	Rest von Poly-(ethylenglykolmethylether), a.k.a. Methoxypoly-(ethylenoxy), $CH_3O(CH_2CH_2O)_{110}$-, (durchschn. MG = 5000)
PEGX	Rest von Poly-(ethylenglykolmethylether), $CH_3O(CH_2CH_2O)_n$-, n = 2 – 225, (durchschn. MG = 100 bis 10 000)

[0034] Der Ausdruck "hydrophile Aminosäure (Haa)" bezieht sich auf eine Aminosäure mit mindestens einer hydrophilen funktionellen Gruppe zusätzlich zu den Gruppen, die für die Bildung der Peptidbindung erforderlich sind, z. B. Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin, Histidin, Lysin, Serin, Threonin und

ihre Homologen.

[0035] Der Ausdruck "lipophile Aminosäure (Laa)" bezieht sich auf eine ungeladene, aliphatische oder aromatische Aminosäure, wie Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Valin und ihre Homologen.

[0036] Für die Zwecke der Erfindung wird Alanin als "amphiphil" eingestuft, d. h. es kann entweder hydrophil oder lipophil wirken.

[0037] Der Ausdruck "physiologisch aktives, verkürztes Homologes oder Analoges von PTH oder PTHrp" bezieht sich auf ein Polypeptid mit einer Sequenz, die weniger als die volle Anzahl der Aminosäuren in PTH oder PTHrp umfasst, die jedoch eine ähnliche physiologische Reaktion hervorruft. Das verkürzte PTH oder PTHrp muss nicht vollständig homolog mit PTH oder PTHrp sein, um eine ähnliche physiologische Reaktion hervorzurufen. PTH(1-34) und PTHrp(1-34) stellen bevorzugte, jedoch nicht die einzigen Vertreter dieser Gruppe dar.

[0038] Der Ausdruck "amphipathische α-Helix" bezieht sich auf die Sekundärstruktur bestimmter Polypeptide, bei denen die Aminosäuren eine α-helikale Konfiguration mit gegenüberliegenden polaren und nicht-polaren Flächen aufweisen, die entlang der Längsachse der Helix orientiert sind. Die Möglichkeit einer α-helikalen Struktur im in Frage stehenden Polypeptid kann in gewissem Umfang ermittelt werden, indem man ein "Schiffer-Edmundson Wheel" (M. Schiffer und A. B. Edmundson, Biophys. J. Bd. 7 (1967), S. 121) mit entsprechender Ganghöhe konstruiert und die Segregation der hydrophilen und lipophilen Reste an gegenüberliegenden Flächen des die Helix umschreibenden Zylinders feststellt. Alternativ deuten empirische Anzeichen, wie Daten des Zirkulardichroismus oder der Röntgenbeugung, auf die Anwesenheit einer α-helikalen Region in einem gegebenen Polypeptid hin. Eine ideale α-Helix weist 3,6 Aminosäurereste pro Umdrehung auf, wobei benachbarte Seitenketten durch 100° eines Bogens getrennt sind. Eisenberg et al. (Nature, Bd. 299 (1982), S. 371-374, und Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Bd. 81 (1984), S. 140-144) haben eine Hydrophobizitätsskala mit dem helikalen Rad kombiniert, um das Konzept der amphipathischen Helices auf eine quantitative Basis zu stellen. Das durchschnittliche hydrophobe Moment ist als die Vektorsumme der Hydrophobizitäten der die Helix bildenden Aminosäurekomponenten definiert. Die folgenden Hydrophobizitäten für die Aminosäuren entsprechen den von Eisenberg (1984) als "Consensus"-Skala angegebenen Werten:

Ile 0,73; Phe 0,61; Val 0,54; Leu 0,53; Trp 0,37;
Met 0,26; Ala 0,25; Gly 0,16; Cys 0,04; Tyr 0,02;
Pro –0,07; Thr –0,18; Ser –0,26; His –0,40; Glu –0,62;
Asn –0,64; Gln –0,69; Asp –0,72;
Lys –1,10; Arg –1,76.

[0039] Das hydrophobe Moment, μ_H, für eine ideale α-Helix mit 3,6 Resten pro Drehung (oder einem Bogen von 100° (= 360°/3,6) zwischen Seitenketten) kann folgendermaßen berechnet werden:

$$\mu H = [(\Sigma H_N \sin\delta(N-1))^2 + (\Sigma H_N \cos\delta(N-1))^2]^{1/2}$$

, worin H_N den Hydrophobizitätswert der N-ten Aminosäure bedeutet und die Summen über die N Aminosäuren in der Sequenz mit der Periodizität δ = 100° genommen werden. Das hydrophobe Moment kann als durchschnittliches hydrophobes Moment pro Rest angegeben werden, indem man μ_H durch N dividiert, wodurch man $<\mu_H>$ erhält. Ein Wert von $<\mu_H>$ bei 100 ± 20° von etwa 0,20 oder mehr lässt auf die Bildung einer amphipathischen Helix schließen. Die $<\mu_H>$-Werte bei 100° für hPTHrp(22-31) und hPTH(22-31) betragen 0,19 bzw. 0,37.

[0040] Cornett et al. (J. Mol. Biol., Bd. 195 (1987), S. 659-685) haben die Untersuchung von amphipathischen α-Helices noch weiter ausgedehnt, indem sie den "amphipathischen Index" als Maß einer Vorhersage für die Amphipathizität einführten. Sie zogen den Schluss, dass etwa die Hälfte aller bekannten α-Helices amphipathisch ist und dass die dominante Frequenz 97,5° anstelle von 100° beträgt, wobei die Anzahl der Reste pro Umdrehung näher an 3,7 als an 3,6 liegt. Obgleich derartige Verfeinerungen von wissenschaftlichem Interesse sind, reicht die grundlegende Vorgehensweise von Eisenberg et al. aus, um eine gegebene Sequenz als amphipathisch einzustufen, insbesondere wenn man eine Sequenz von Beginn an unter Bildung einer amphipathischen α-Helix konzipiert.

[0041] Einer ersatzweisen amphipathischen, α-helikalen Aminosäuresequenz kann es an Homologie mit der Sequenz eines gegebenen Segments eines natürlich vorkommenden Polypeptids fehlen, jedoch in physiologischer Umgebung zur Bildung einer ähnlichen sekundären Struktur, d. h. einer α-Helix mit gegenüberliegenden polaren und nicht-polaren Flächen, führen. Ein Ersatz der natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz durch eine alternative Sequenz kann die physiologische Aktivität, die Stabilität oder andere Eigenschaften des veränderten Ausgangspolypeptids in günstiger Weise beeinflussen. Eine Richtlinie zur Konzeption und Auswahl derartiger Sequenzen wird von J. L. Krstenansky et al., FEBS Letters, Bd. 242 (1989), S. 409-413 und J. P. Segrest et al., Proteins: Structure, Function and Genetics, Bd. 8 (1990), S. 103-117, neben anderen Autoren bereitgestellt.

[0042] Die erfindungsgemäße amphipathische α-Helix mit 10 Aminosäuren weist die folgende Formel auf:

Haa (Laa Laa Haa Haa)$_2$ Laa

worin die Haa's aus der Gruppe der hydrophilen Aminosäuren und die Laa's aus der Gruppe der lipophilen Aminosäuren gemäß der vorstehenden Definition ausgewählt sind. Unter Annahme einer idealisierten α-Helix sind die Reste 1, 4, 5, 8 und 9 entlang einer Fläche (A) der Helix innerhalb eines Bogens von etwa 140° verteilt, während die Reste 2, 3, 6, 7 und 10 einen gegenüberliegenden Bogen von 140° auf der anderen Fläche (B) der Helix besetzen. Vorzugsweise weisen sämtliche Reste auf einer Fläche die gleiche Polarität auf, während sämtliche Reste auf der anderen Fläche die entgegengesetzte Polarität aufweisen, d. h. wenn die Fläche A insgesamt hydrophil ist, ist die Fläche B insgesamt lipophil und umgekehrt. Der Fachmann erkennt, dass zwar die Helices der Erfindung durch die Formel

Haa (Laa Laa Haa Haa)$_2$ Laa

wiedergegeben werden, dass aber die umgekehrte Sequenz

Laa (Haa Haa Laa Laa)$_2$ Haa

ebenfalls die Kriterien der Verteilung der Reste erfüllt und in gleichwertiger Weise die erfindungsgemäßen Helices beschreibt.

[0043] Alanin kann entweder hydrophile oder lipophile Aminosäuren ersetzen, da Ala sich leicht auf beiden Flächen einer amphipathischen α-Helix aufhalten kann, obgleich Ala$_{10}$ keine amphipathische α-Helix bildet. Im allgemeinen werden Prolin, Cystein und Tyrosin nicht verwendet. Jedoch können ihre Anwesenheit und andere zufällige Fehler toleriert werden, z. B. ein hydrophiler Rest auf der lipophilen Fläche, sofern die restlichen Aminosäuren im Segment im wesentlichen der Unterteilung hydrophile Fläche/lipophile Fläche entsprechen. Ein zweckmäßiges Verfahren, mit dem bestimmt werden kann, ob eine Sequenz eine ausreichende Amphipathizität für eine erfindungsgemäße Sequenz aufweist, besteht in der Berechnung des vorstehend definierten durchschnittlichen hydrophoben Moments. Wenn das durchschnittliche maximale Moment pro Rest bei 100° ± 20° den Wert von etwa 0,20 übersteigt, so bildet die Sequenz eine amphipathische Helix und stellt eine erfindungsgemäße Sequenz dar.

[0044] Beispielsweise wird das durchschnittliche hydrophobe Moment pro Rest bei 100° für (SEQ ID NO: 26), Xaa = Glu, folgendermaßen berechnet:

A.A.	**H_N**	**δ(N-1)**	**H sin δ(N-1)**	**H cos δ(N-1)**
E	-0,62	0	0	-0,62
L	0,53	100	0,52	-0,17
L	0,53	200	-0,18	-0,50
E	-0,62	300	0,34	-0,31
K	-1,1	400	-0,70	-0,85
L	0,53	500	0,34	-0,41
L	0,53	600	-0,46	-0,27
E	-0,62	700	0,21	-0,58
K	-1,1	800	-1,08	-0,19
L	0,53	900	0	-0,53
			Σ=0,81	Σ=-4,43

$\mu_H = [(0,81)_2 + (-4,43)^2]^{½} = 4,50$

$<\mu_H> = 4,50/10 = 0,45$

[0045] Für diese Sequenz liegt das durchschnittliche maximale hydrophobe Moment bei 92° und weist einen Wert von 0,48 auf.

[0046] Bei der Anwendung dieses Konzepts auf Parathyroidhormon und Parathyroidhormon-verwandtes Peptid wurde die Hypothese aufgestellt, dass entweder eine oder beide Regionen (7-16) und (22-31) eine sekundäre α-helikale Struktur aufweisen können und durch eine nicht-homologe Sequenz mit ähnlichen strukturellen Tendenzen ersetzt werden können, ohne dass die biologische Aktivität verloren geht oder eine Immunoreaktion eingeleitet wird.

Bevorzugte Ausführungsformen

[0047] Gemäß einem Aspekt werden erfindungsgemäß Analoge von PTH, PTHrp und physiologisch aktive, verkürzte Analoge und Homologe von PTH und PTHrp oder Salze davon bereitgestellt, worin die Aminosäurereste (22-31) eine amphipathische α-Helix bilden und wobei die Sequenz der Reste (22-31) ausgewählt ist unter:

a) $Xaa^1\ Xaa^2$ Leu $Xaa^4\ Xaa^5$ Leu $Xaa^7\ Xaa^8\ Xaa^9\ Xaa^{10}$
1 5 10

worin Xaa^1 und Xaa^4 unabhängig voneinander Glu, Glu(OCH_3), His oder Phe bedeuten; Xaa^2 Leu oder Phe bedeutet; Xaa^5 Lys oder His bedeutet; Xaa^7 und Xaa^{10} unabhängig voneinander Leu oder Ile bedeuten; Xaa^8 Ala, Arg oder Glu bedeutet; und Xaa^9 Lys oder Glu bedeutet (SEQ ID NO: 85); vorzugsweise

Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Xaa Lys Leu
1 5 10

worin Xaa Glu oder Arg bedeutet (SEQ ID NO:26);

b) $Xaa^1\ Xaa^2$ Leu Xaa^4 Arg Leu Leu Xaa^8 Arg Leu
1 5 10

worin Xaa^1 und Xaa^4 unabhängig voneinander Glu, Glu(OCH_3), His oder Phe bedeuten; Xaa^2 Leu oder Phe bedeutet; Xaa^8 Glu, Lys oder Lys($COCH_2$PEGX) bedeutet und PEGX einen Poly-(ethylenglykolmethylether)-Rest mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10 000 bedeutet (SEQ ID NO: 86); vorzugsweise

Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Xaa Arg Leu
1 5 10

worin Xaa Glu, Lys oder Lys($COCH_2$PEGX) bedeutet und PEGX einen Poly-(ethylenglykolmethylether)-Rest mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10 000 bedeutet (SEQ ID NO: 27);

c) Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu (SEQ ID NO: 28);
1 5 10

d) Ser Leu Leu Ser Ser Leu Leu Ser Ser Leu (SEQ ID NO: 29);
1 5 10

e) Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu (SEQ ID NO: 30).
1 5 10

[0048] Gemäß einem weiteren Aspekt werden erfindungsgemäß Analoge von PTH, PTHrp und die physiologisch aktiven, verkürzten Analogen und Homologen von PTH und PTHrp oder Salze davon der folgenden Formel bereitgestellt:

$Xaa^1\ Xaa^2\ Xaa^3\ Xaa^4\ Xaa^5\ Xaa^6\ Xaa^7$ Leu His $Xaa^{10}\ Xaa^{11}$ Gly Xaa^{13} Ser Ile Gln Xaa^{17} Leu $Xaa^{19}\ Xaa^{20}\ Xaa^{21}\ Xaa^{22\text{-}31}\ Xaa^{32}\ Xaa^{33}\ Xaa^{34}\ Xaa^{35}\ Xaa^{36}\ Xaa^{37}\ Xaa^{38}$ Term, worin

Xaa^1 abwesend ist oder Ala bedeutet;
Xaa^2 abwesend ist oder Val bedeutet;
Xaa^3 abwesend ist oder Ser bedeutet;
Xaa^4 abwesend ist oder Glu oder Glu(OCH_3) bedeutet;
Xaa^5 abwesend ist oder His oder Ala bedeutet;
Xaa^6 abwesend ist oder Gln bedeutet;
Xaa^7 abwesend ist oder Leu bedeutet;
Xaa^{10} und Xaa^{17} unabhängig voneinander Asp oder Asp(OCH_3) bedeuten;

Xaa^{11} Lys, Arg oder Leu bedeutet;
Xaa^{13} Lys, Arg, Tyr, Cys, Leu, Cys($CH_2CONH(CH_2)_2NH$(Biotinyl)), Lys(7-Dimethylamino-2-oxo-2H-1-benzopyran-4-acetyl), oder Lys(Dihydrocinnamoyl) bedeutet;
Xaa^{20} Arg oder Leu bedeutet;
Xaa^{19} und Xaa^{21} unabhängig voneinander Lys, Ala oder Arg bedeuten;
Xaa^{22-31} ausgewählt sind unter (SEQ ID NOS: 26, 27, 28, 29 oder 30);
Xaa^{32} His, Pro oder Lys bedeutet;
Xaa^{33} abwesend ist oder Pro, Thr, Glu, oder Ala bedeutet;
Xaa^{34} abwesend ist oder Pro, Arg, Met, Ala, hSer, hSer-Lacton, Tyr, Leu oder 1,4-Diaminobutyryllactam bedeutet;
Xaa^{35} abwesend ist oder Pro, Glu, Ser, Ala oder Gly bedeutet;
Xaa^{36} abwesend ist oder Ala, Arg oder Ile bedeutet;
Xaa^{37} abwesend ist oder Arg, Trp oder 3-(2-Naphthyl)-L-alanin bedeutet;
Xaa^{38} abwesend ist oder Ala oder hSer bedeutet oder
Xaa^{38-42} Thr Arg Ser Ala Trp bedeutet;
und Term OR oder NR_2 bedeutet, wobei jeder Rest R unabhängig voneinander H, (C_1-C_4)-Alkyl oder Phenyl-(C_1-C_4)-alkyl bedeutet;
und pharmazeutisch verträgliche Salze davon.

[0049] Gemäß einem weiteren Aspekt umfasst die Erfindung Polypeptidanaloge des physiologisch aktiven, verkürzten Homologen hPTHrp(1-34) gemäß Formel (I):

Ala Val Ser Glu Xaa^5 Gln Leu Leu His Asp Xaa^{11} Gly Xaa^{13} Ser Ile Gln Asp Leu Xaa^{19} Arg Xaa^{21} Xaa^{22-31} Xaa^{32} Xaa^{33} Xaa^{34} Term,

worin:
Xaa^5 His oder Ala bedeutet;
Xaa^{11} und Xaa^{13} uabhängig voneinander Lys, Arg oder Leu bedeuten;
Xaa^{19} und Xaa^{21} uabhängig voneinander Ala oder Arg bedeuten;
Xaa^{22-31} ausgewält ist unter:

a) Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Xaa Lys Leu,
1 5 10

worin Xaa Glu oder Arg bedeutet (SEQ ID NO: 26)

b) Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Xaa Arg Leu,
1 5 10

worin Xaa Glu, Lys oder Lys($COCH_2$PEGX) bedeutet, PEGX einen Poly-(ethylenglykolmethylether)-Rest mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10 000 bedeutet (SEQ ID NO: 27);

c) Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu (SEQ ID NO:28);
1 5 10

d) Ser Leu Leu Ser Ser Leu Leu Ser Ser Leu (SEQ ID NO:29);
1 5 10

e) Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu (SEQ ID NO:30);
1 5 10

Xaa^{32} His oder Lys bedeutet;
Xaa^{33} Thr, Glu oder Ala bedeutet;
Xaa^{34} Ala, hSer, Tyr oder Leu bedeutet;
und Term Gly Arg Arg, Lacton, OH oder NR_2 hat, worin jeder Rest R H oder (C_1-C_4)-Alkyl bedeutet; und pharmazeutisch verträgliche Salze davon (Formel I).

[0050] Ein speziellerer Aspekt der Erfindung umfasst Polypeptide der Formel (I), worin Xaa^{22-31} die Bedeutung (SEQ ID NO: 26) hat, wobei $<\mu_H>$ bei 100° den Wert 0,45 übersteigt. Ein noch stärker bevorzugter Aspekt der Erfindung umfasst die Polypeptide der Formel (I), worin Xaa^{22-31} die Bedeutung (SEQ ID NO: 26) hat; Xaa^{11} und Xaa^{13} beide Lys bedeuten; und Xaa^{19} und Xaa^{21} beide Arg bedeuten.

[0051] Zu repräsentativen Polypeptiden gehören (ohne Beschränkung hierauf):

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Arg Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 5);

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 6);

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH2 (SEQ ID NO: 7);

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr hSer NH2 (SEQ ID NO: 8);

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr hSerlac (SEQ ID NO: 9);

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala Gly Arg Arg OH (SEQ ID NO: 10); und
35
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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu Lys Glu Leu NH2 (SEQ ID NO: 11).

[0052] Ein weiterer Aspekt der Erfindung umfasst Polypeptide der Formel (I), worin Xaa^{22-31} die Bedeutung (SEQ ID NO: 26) hat; Xaa^{11} und Xaa^{13} beide Lys bedeuten; und einer der Reste Xaa^{19} und Xaa^{21} Arg und der andere Ala bedeutet. Zu repräsentativen Polypeptiden dieser Untergattung gehören (ohne Beschränkung hierauf):

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

Gln Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala NH2 (SEQ ID NO: 12) und

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

Gln Asp Leu Arg Arg Ala Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala NH2 (SEQ ID NO: 13).

[0053] Gemäß einem weiteren Aspekt umfasst die Erfindung Polypeptide der Formel (I), worin Xaa^{22-31} die Bedeutung (SEQ ID NO: 26) hat; einer der Reste Xaa^{11} und Xaa^{13} Leu und der andere Lys bedeutet; und Xaa^{19} und Xaa^{21} beide Arg bedeuten. Zu repräsentativen Polypeptiden dieser Untergattung gehören (ohne Beschränkung hierauf):

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

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Ala Leu OH (SEQ ID NO: 14).

[0054] Ein weiterer Aspekt der Erfindung umfasst Polypeptide der Formel (I), worin Xaa^{22-31} die Bedeutung (SEQ ID NO: 27) hat, wobei $<\mu_H>$ bei 100° den Wert 0,50 übersteigt. Ein weiterer Aspekt der Erfindung umfasst Polypeptide der Formel (I), worin Xaa^{22-31} die Bedeutung (SEQ ID NO: 27) hat; Xaa^{11} und Xaa^{13} beide Lys oder beide Arg bedeuten; und Xaa^{19} und Xaa^{21} beide Arg bedeuten. Zu repräsentativen Polypeptiden dieser Untergattung gehören (ohne Beschränkung hierauf):

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 Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg
20 25 30

Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 15);

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

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg
20 25 30

Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 16);

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

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Lys Arg
20 25 30

Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 17);

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

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu
20 25

Lys($COCH_2$PEG2) Arg Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 18); und
30

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

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu
20 25

Lys($COCH_2$PEG5000) Arg Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 19).
30

[0055] Gemäß einem weiteren Aspekt umfasst die Erfindung Polypeptide der Formel (I), worin Xaa^{22-31}. die Bedeutung (SEQ ID NO: 28) hat, wobei $<\mu_H>$ bei 100° einen Wert von etwa 0,25 hat. Zu repräsentativen Polypeptiden dieser Untergattung gehören (ohne Beschränkung hierauf):

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 Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala
20 25 30

Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 20).

[0056] Ein weiterer Aspekt der Erfindung umfasst Polypeptide der Formel (I), worin Xaa^{22-31} die Bedeutung (SEQ ID NO: 29) hat, wobei $<\mu_H>$ bei 100° einen Wert von etwa 0,28 hat. Zu repräsentativen Polypeptiden dieser Untergattung gehören (ohne Beschränkung hierauf):

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 Ser Leu Leu Ser Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30

Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 21).

[0057] Ein weiterer Aspekt der Erfindung umfasst Polypeptide der Formel (I), worin Xaa^{22-31} die Bedeutung (SEQ ID NO: 30) hat, wobei $<\mu_H>$ bei 100° einen Wert von etwa 0,29 hat. Zu repräsentativen Polypeptiden dieser Untergattung gehören (ohne Beschränkung hierauf):

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 Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 22).

[0058] Ein weiterer Aspekt der Erfindung umfasst Polypeptidanaloge des physiologisch aktiven, verkürzten Homologen bPTH(1-34) gemäß Formel (11):

Xaa^{1} Val Ser Glu Ile Gln Xaa^{7} Xaa^{8} His Asn Leu Gly Lys His Leu Xaa^{16} Ser Xaa^{18} Xaa^{19} Arg Xaa^{21} Xaa^{22-31} His Asn Xaa^{34} Term,

worin:
Xaa^{1} Ser oder Ala bedeutet;
Xaa^{7} Leu oder Phe bedeutet;
Xaa^{8} Met oder Nle bedeutet;
Xaa^{16} Asn oder Ser bedeutet;
Xaa^{18} Leu, Met oder Nle bedeutet;
Xaa^{19} Glu oder Arg bedeutet;
Xaa^{21} Val oder Arg bedeutet;
Xaa^{22-31} ausgewählt ist unter (SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29 und 30);
Xaa^{34} Phe oder Tyr bedeutet;
Term die Bedeutung OH oder NR2 hat, wobei jeder der Reste R H oder (C_1-C_4)-Alkyl bedeutet;
und die pharmazeutisch verträglichen Salze davon (Formel II). Zu repräsentativen Polypeptiden gehören (ohne Beschränkung hierauf):

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Nle His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Nle Glu Arg Val Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Asn Tyr NH_2 (SEQ ID NO:23) und
Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Nle His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Nle Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Asn Tyr NH2 (SEQ ID NO: 24).

[0059] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wurde überraschenderweise festgestellt, dass Homologe und Analoge von PTH und PTHrP mit weniger als 34 Aminosäuren ebenfalls starke Knochenumbildungsmittel darstellen. Diese Verbindungen weisen die folgende allgemeine Formel auf:

Ala Val Ser Glu Xaa^{5} Gln Leu Leu His Asp Xaa^{11} Gly Xaa^{13} Ser Ile Gln Asp Leu Xaa^{19} Arg Xaa^{21} Xaa^{22-31} Xaa^{32} Xaa^{33} Xaa^{34} Term.

[0060] Zu repräsentativen Polypeptiden gehören (ohne Beschränkung hierauf):

Verbindung 41: AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHP-NH_2 (SEQ ID NO: 55)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Pro NH_2 (SEQ ID NO: 55).

[0061] Physikalische Daten
F. 142,8–166,1°C $[\alpha]_D25$ –53,80 (c 0,38, H_2O)
FAB($C_{173}H_{295}N_{55}O_{49}$): $[M + H]^+$ 3929

AAA:	Asx	2,0 (2)	Glx	5,7 (6)	Ser	1,8 (2)
	His	3,0 (3)	Gly	1,1 (1)	Ala	0,9 (1)
	Arg	2,8 (3)	Val	1,2 (1)	Ile	0,9 (1)
	Leu	7,4 (8)	Lys	4,4 (4)	Pro	0,9 (1)

Verbindung 42: AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LP-NH_2 (SEQ ID NO: 56)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu Pro NH_2 (SEQ ID NO: 56).

[0062] Physikalische Daten
F. 161,0–177,0°C $[\alpha]_D25$ –61,97 (c 0,19, H_2O)
FAB($C_{167}H_{288}N_{52}O_{48}$): $[M + H]^+$ 3792,0

AAA:	Asx	2,2 (2)	Glx	5,9 (6)	Ser	1,9 (2)
	His	2,1 (2)	Gly	1,1 (1)	Ala	1,0 (1)
	Arg	3,0 (3)	Val	1,1 (1)	Ile	1,0 (1)
	Leu	7,9 (8)	Lys	4,3 (4)	Pro	0,9 (1)

[0063] Der Fachmann erkennt, dass zahlreiche Abänderungen der Polypeptidanalogen hergestellt werden können, die die erwünschten Eigenschaften der hier beschriebenen Produkte aufweisen, vorausgesetzt, dass eine Aminosäuresequenz mit einem durchschnittlichen hydrophoben Moment pro Rest bei 100° ± 20° von mehr als 0,20 in den Positionen (22-31) eingesetzt ist.

Klassische Synthese der Polypeptide

[0064] Die erfindungsgemäßen Polypeptide lassen sich nach den in folgenden Druckschriften beschriebenen Verfahren herstellen: J. M. Stewart und J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Auflg., Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois (1984), und J. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, Bd. 2, Academic Press, New York, (1973) für die Festphasensynthese und E. Schroder und K. Lubke, The Peptides, Bd. I, Academic Press, New York, (1965), für die Synthese in Lösung.

[0065] Im allgemeinen beinhalten diese Verfahren die sequenzielle Addition von geschützten Aminosäuren an eine wachsende Peptidkette. Normalerweise können entweder die Amino- oder Carboxylgruppe der ersten Aminosäure und etwalge reaktive Seitenkettengruppen geschützt sein. Diese geschützte Aminosäure wird sodann entweder an einen inerten festen Träger angeheftet oder in Lösung verwendet. Die nächste Aminosäure in der Sequenz, die ebenfalls in geeigneter Weise geschützt ist, wird unter Bedingungen, die zur Bildung der Amidbindung führen, zugesetzt. Nachdem sämtliche erwünschten Aminosäuren in der geeigneten Sequenz verknüpft sind, werden Schutzgruppen und etwalger fester Träger entfernt, wodurch man das rohe Polypeptid erhält. Das Polypeptid wird entsalzt und gereinigt, vorzugsweise auf chromatographischem Wege, wodurch man das Endprodukt erhält.

[0066] Ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung der Analogen der physiologisch aktiven, verkürzten Polypeptide mit weniger als etwa 40 Aminosäuren beinhaltet eine Festphasen-Peptidsynthese. Bei diesem Verfahren werden die α-Aminofunktionen (N^{α}) und etwalge reaktive Seitenketten durch säure- oder basenempfindliche Gruppen geschützt. Die Schutzgruppe soll gegenüber den Bedingungen der Bildung der Peptidverknüpfung stabil sein, während sie leicht entfernbar ist, ohne dass die vorhandene Polypeptidkette beeinträchtigt wird. Zu geeigneten α-Aminoschutzgruppen gehören (ohne Beschränkung hierauf): tert.-Butoxycarbonyl (Boc), Benzyloxycarbonyl (Cbz), o-Chlorbenzyloxycarbonyl, Biphenylisopropyloxycarbonyl, tert.-Amyloxycarbonyl (Amoc), Isobornyloxycarbonyl, α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, o-Nitrophenylsulfenyl, 2-Cyano-tert.-butoxycarbonyl, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) und dergl., vorzugsweise tert.-Butoxycar-

bonyl (Boc). Zu geeigneten Seitenketten-Schutzgruppen gehören (ohne Beschränkung hierauf): Acetyl, Benzyl (Bzl), Benzyloxymethyl (Bom), o-Brombenzyloxycarbonyl, tert.-Butyl, tert.-Butyldimethylsilyl, 2-Chlorbenzyl (Cl-z), 2,6-Dichlorbenzyl, Cyclohexyl, Cyclopentyl, Isopropyl, Pivalyl, Tetrahydropyran-2-yl, Tosyl (Tos), Trimethylsilyl und Trityl.

[0067] Bei der Festphasensynthese wird die C-terminale Aminosäure zunächst an einen geeigneten Harzträger gebunden. Zu geeigneten Harzträgern gehören Materialien, die gegenüber den Reagenzien und den Reaktionsbedingungen der stufenweisen Kondensations- und Schutzgruppenentfernungsreaktionen inert sind und die in den verwendeten Medien unlöslich sind. Zu Beispielen für handelsübliche Harze gehören Styrol/Divinylbenzol-Harze, die mit einer reaktiven Gruppe modifiziert sind, z. B. chlormethyliertes Co-Poly-(styrol-divinylbenzol), hydroxymethyliertes Co-Poly-(styrol-divinylbenzol) und dergl. Benzyliertes, hydroxymethyliertes Phenylacetamidomethyl (PAM)-Harz wird bevorzugt. Wenn es sich beim C-Terminus der Verbindung um ein Amid handelt, stellt p-Methylbenzhydrylamino-co-Poly-(styrol-divinylbenzol)-Harz ein bevorzugtes Harz dar.

[0068] Das Anheften am PAM-Harz kann durch Umsetzung der N^{α}-geschützten Aminosäure, vorzugsweise der Boc-Aminosäure, als Ammonium-, Caesium-, Triethylammonium-, 1,5-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-5-en-, Tetramethylammonium- oder ein ähnliches Salz in Ethanol, Acetonitril, N,N-Dimethylformamid (DMF) und dergl., vorzugsweise des Caesiumsalzes in DMF, mit dem Harz bei einer erhöhten Temperatur, vorzugsweise von etwa 40 bis 60°C und vorzugsweise bei etwa 50°C für eine Zeitspanne von etwa 12 bis 72 Stunden, vorzugsweise von etwa 48 Stunden erreicht werden.

[0069] Die N^{α}-Boc-Aminosäure kann an das Benzhydrylaminharz beispielsweise durch eine mit N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC)/1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) vermittelte Kupplung für etwa 2 bis etwa 24 Stunden, vorzugsweise etwa 2 Stunden, bei einer Temperatur von etwa 10 bis 50°C und vorzugsweise von 25°C in einem Lösungsmittel, wie Dichlormethan oder Dimethylformamid und vorzugsweise Dichlormethan, angeheftet werden.

[0070] Die anschließende Kupplung der geschützten Aminosäuren kann nach bekannten Verfahren und typischerweise in einem automatisierten Peptidsynthesegerät durchgeführt werden. Im Anschluß an die Neutralisation mit Triethylamin oder einer ähnlichen Base werden die einzelnen geschützten Aminosäuren vorzugsweise in einem etwa 1,5- bis 2,5-fachen molaren Überschuß eingebracht, die Kupplung wird in einem inerten, nicht-wäßrigen, polaren Lösungsmittel, wie Dichlormethan, DMF oder Gemischen davon, und vorzugsweise in Dichlormethan bei Umgebungstemperatur durchgeführt. Zu repräsentativen Kupplungsmitteln gehören N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), N,N'-Diisopropylcarbodiimid (DIC) oder andere Carbodiimide entweder allein oder in Gegenwart von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), O-Acylharnstoffen, Benzotriazol-1-yl-oxytris-(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluorphosphat (PyBop), N-Hydroxysuccinimid, andere N-Hydroxyimide oder Oxime. Alternativ können geschützte aktive Aminosäureester (z. B. p-Nitrophenyl, Pentafluorphenyl und dergl.) oder symmetrische Anhydride verwendet werden.

[0071] Am Schluß der Festphasensynthese wird das vollständig geschützte Peptid vom Harz entfernt. Wenn die Verknüpfung mit dem Harzträger vom Benzylestertyp ist, kann die Spaltung durch Aminolyse mit einem Alkylamin oder Fluoralkylamin für Peptide mit einem Alkylamid-C-Terminus oder durch Aminolyse beispielsweise mit Ammoniak/Methanol oder Ammoniak/Ethanol für Peptide mit einem unsubstituierten Amid-C-Terminus bei Temperaturen von –10 bis 50°C und vorzugsweise etwa 25°C für eine Zeitspanne von etwa 12 bis 24 Stunden und vorzugsweise von etwa 18 Stunden durchgeführt werden. Peptide mit einem Hydroxy-C-Terminus können durch HF oder durch anderweitig stark sauren Verfahren zur Schutzgruppenentfernung oder durch Verseifung abgespalten werden. Alternativ kann das Peptid vom Harz durch Umesterung, z. B. mit Methanol, und anschließende Aminolyse und Verseifung entfernt werden. Das geschützte Peptid kann durch Kieselgelchromatographie gereinigt werden.

[0072] Die Seitenketten-Schutzgruppen können vom Peptid durch Behandlung des Aminolyseprodukts beispielsweise mit wasserfreiem flüssigem Fluorwasserstoff in Gegenwart von Anisol oder anderen Carboniumionen-Abfangmitteln, Behandlung mit einem Fluorwasserstoff/Pyridin-Komplex, Behandlung mit Tris-(trifluoracetyl)-bor und Trifluoressigsäure, durch Reduktion mit Wasserstoff und Palladium auf Kohlenstoff oder Polyvinylpyrrolidon oder durch Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak und vorzugweise mit flüssigem Fluorwasserstoff und Anisol bei einer Temperatur von etwa –10 bis +10°C und vorzugsweise von etwa 0°C für eine Zeitspanne von etwa 15 Minuten bis 2 Stunden und vorzugsweise von etwa 1,5 Stunden entfernt werden.

[0073] Für Peptide am Benzhydrylaminharz können die Stufen zur Abspaltung vom Harz und die Schutzgruppenentfernung in einer einzigen Stufe kombiniert werden, indem man flüssigen Fluorwasserstoff und Anisol gemäß den vorstehenden Ausführungen verwendet.

[0074] Die Lösung kann entsalzt werden (z. B. mit BioRad AG-3®-Anionenaustauscherharz) und das Peptid kann durch eine Folge von chromatographischen Stufen entsalzt werden, wobei man einen oder sämtliche der folgenden Typen anwendet: Ionenaustausch an einem schwach basischen Harz in der Acetatform; hydrophobe Adsorptionschromatographie an underivatisiertem Co-Poly-(styroldivinylbenzol), z. B. Amberlite® XAD; Kieselgel-Adsorptionschromatographie; Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethylcellulose; Verteilungschromatographie, z. B. an Sephadex® G-25; Gegenstromverteilung; oder Hochleistungs-Flüssigchroma-

torgraphie (HPLC), insbesondere Umkehrphasen-HPLC an einer mit Octyl- oder Octadecylsilylsiliciumdioxid (ODS) gebundenen Phase als Säulenpackung.

[0075] Somit betrifft ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden und pharmazeutisch verträglichen Salzen davon, wobei die Verfahren die sequenzielle Kondensation von geschützten Aminosäuren an einem geeigneten Harzträger, das Entfernen der Schutzgruppen und des Harzträgers und das Reinigen des Produkts umfassen, wodurch man Analoge der physiologisch aktiven, verkürzten Homologen und Analogen von PTH und PTHrp und vorzugsweise PTH(1-34) und PTHrp(1-34) erhält, bei denen die Aminosäuren in den Positionen (22-31) eine amphipathische, α-helikale Peptidsequenz gemäß der vorstehenden Definition bilden.

Rekombinante Synthese der Polypeptide

[0076] Alternativ lassen sich die erfindungsgemäßen Polypeptide durch Klonieren und Exprimieren eines Gens, das für das gewünschte Polypeptid kodiert, herstellen. Bei diesem Verfahren wird ein Plasmid, das die gewünschte DNA-Sequenz enthält, hergestellt und in einen geeigneten Wirtsmikroorganismus, typischerweise ein Bacterium, wie E. coli, oder eine Hefe, wie Saccharomyces cerevisiae, eingeführt, wobei man den Wirtsmikroorganismus zur Bildung mehrfacher Kopien des Plasmids und somit der cDNA, die für die erfindungsgemäßen Polypeptidanalogen kodieren, veranlasst.

[0077] Zunächst wird ein synthetisches Gen, das für das ausgewählte PTH oder PTHrp-Analoge kodiert, mit zweckmäßigen Restriktionsenzym-Spaltungsstellen zur Erleichterung der anschließenden Veränderungen konstruiert. Zum Amplifizieren der Sequenz kann die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gemäß der Lehre von Mullis in den US-Patenten 4 683 195 und 4 683 202 herangezogen werden.

[0078] Das amplifizierte, synthetische Gen kann isoliert und mit einem geeigneten Plasmid, z. B. einem Trp-LE-Plasmid ligiert werden, in das vier Kopien des Gens in Tandemstellung eingeführt werden können. Die Herstellung von Trp-LE-Plasmiden wird in US-Patent 4 738 921 und in EP-A-0 212 532 beschrieben. Trp-LE-Plasmide bilden im allgemeinen 8-10 mal mehr Protein als Trp-E-Plasmide. Das Multikopiengen kann sodann in einem geeigneten Wirt, z. B. E. coli oder S. cerevisiae exprimiert werden.

[0079] Beim hier verwendeten spezifischen Expressionsvektor handelte es sich um Trp-LE-18-Prot (Ile^3, Pro^5) mit einem Gehalt an den folgenden Elementen: ein pBR322-Fragment (EcoRI-BamHI) mit einem Gehalt an dem Ampicillin-Resistenzgen und der Plasmid-Replikationsursprungsstelle; ein EcoRI-SacII-Fragment mit einem Gehalt an dem trp-Promotor und dem trpE-Gen; ein HIV-Protease (Ile^3, Pro^5)-Genfragment (SacII-HindIII); ein bGFR-Genfragment (HindIII-BamHI); und ein Transkriptionsterminator aus dem E. coli-rpoc-Gen. Die HIV-Protease- und bGRF-Genfragmente sind nicht kritisch und können gegebenenfalls durch andere kodierende Sequenzen ersetzt werden.

[0080] Die exprimierten, multimeren Fusionsproteine reichern sich intrazellulär in stabilen Einschlusskörpern an und können durch Zentrifugation vom Rest des zellulären Proteins abgetrennt werden. Das isolierte Fusionsprotein wird in das monomere PTH- oder PTHrp-Analoge umgewandelt und kann durch Kationenaustausch und/oder Umkehrphasen-HPLC gereinigt werden.

[0081] Alternative Verfahren zum Klonieren, Amplifizieren, Exprimieren und Reinigen sind dem Fachmann geläufig. Repräsentative Verfahren werden von Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboraton Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboraton (1989), beschrieben.

Verwendung und Verabreichung

[0082] Die erfindungsgemäßen Polypeptide eignen sich zur Prophylaxe und Therapie von verschiedenen Zuständen bei Säugern, die sich durch Verlust von Knochenmasse bemerkbar machen. Insbesondere sind die erfindungsgemäßen Verbindungen für die prophylaktische und therapeutische Behandlung von Osteoporose und Osteopenie beim Menschen indiziert.

[0083] Im allgemeinen werden die erfindungsgemäßen Polypeptide oder Salze davon in Mengen von etwa 0,002 bis 10 μg/kg Körpergewicht pro Tag und vorzugsweise von etwa 0,04 bis etwa 0,2 μg/kg Körpergewicht pro Tag verabreicht. Für eine weibliche Patientin mit einem Gewicht von 50 kg beträgt die tägliche Dosis des Wirkstoffes etwa 0,1 bis etwa 500 μg und vorzugsweise etwa 2,0 bis etwa 100 μg. Bei anderen Säugern, wie Pferden, Hunden und Rindern, können höhere Dosen erforderlich sein. Diese Dosierung kann in einer herkömmlichen pharmazeutischen Zusammensetzung durch eine einzige Verabreichung, durch mehrfache Anwendungen oder unter kontrollierter Freisetzung je nach Bedarf abgegeben werden, um die wirksamsten Ergebnisse zu erzielen, vorzugsweise durch eine einmalige oder mehrmalige Injektion pro Tag.

[0084] Die Auswahl der genauen Dosis und die Zusammensetzung sowie das geeignetste Dosierungsschema werden unter anderem von den pharmakologischen Eigenschaften des gewählten Polypeptids, der Art und der Schwere des zu behandelnden Zustands und dem physischen und mentalen Zustand des Empfängers beeinflusst.

[0085] Bei der Behandlung von Corticosteroid-induzierter Osteopenie ist zu erwarten, dass die erforderliche Dosis des Polypeptids höher ist, wenn höhere Dosen an Corticosteroiden gegeben werden.

[0086] Zu repräsentativen Verabreichungswegen gehören die orale, parenterale (einschließlich subkutane, intramuskuläre und intravenöse), rektale, buccale (einschließlich sublinguale), pulmonale, transdermale und intranasale Verabreichung.

[0087] Pharmazeutisch verträgliche Salze behalten die gewünschte biologische Aktivität des Ausgangspolypeptids ohne toxische Nebenwirkungen. Zu Beispielen für Salze gehören (a) mit anorganischen Säuren gebildete Säureadditionssalze, z. B. mit Salzsäure, Bromwasserstoffsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Salpetersäure und dergl.; und mit organischen Säuren gebildete Salze, z. B. mit Essigsäure, Oxalsäure, Weinsäure, Bernsteinsäure, Maleinsäure, Fumarsäure, Gluconsäure, Citronensäure, Äpfelsäure, Ascorbinsäure, Benzoesäure, Gerbsäure, Pamoasäure, Alginsäure, Polyglutaminsäure, Naphthalinsulfonsäuren, Naphthalindisulfonsäuren, Polygalacturonsäure und dergl.; (b) Basenadditionssalze, die mit mehrwertigen Metallkationen gebildet sind, z. B. mit Zink, Calcium, Wismut, Barium, Magnesium, Aluminium, Kupfer, Cobalt, Nickel, Cadmium und dergl.; oder die mit organischen Kationen gebildet sind, wie N,N'-Dibenzylethylendiamin oder Ethylendiamin; oder (c) Kombinationen aus (a) und (b), z. B. ein Zinktannatsalz und dergl.

[0088] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft pharmazeutische Zusammensetzungen, die als Wirkstoff ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon im Gemisch mit einem pharmazeutisch verträglichen, nicht-toxischen Träger enthalten. Wie vorstehend erwähnt, können derartige Zusammensetzungen für die parenterale (subkutane, intramuskuläre oder intravenöse) Verabreichung zubereitet werden, insbesondere in Form von flüssigen Lösungen oder Suspensionen; für die orale oder bukkale Verabreichung, insbesondere in Form von Tabletten oder Kapseln; für die pulmonale oder intranasale Verabreichung, insbesondere in Form von Pulvern, Nasentropfen und Aerosolen; und für die rektale oder transdermale Verabreichung.

[0089] Die Zusammensetzungen können zweckmäßigerweise in Dosiseinheitsform verabreicht werden. Sie lassen sich nach beliebigen, auf dem pharmazeutischen Gebiet bekannten Verfahren herstellen, wie sie beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. Auflage, Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985), beschrieben sind. Zubereitungen für die parenterale Verabreichung können als Träger, steriles Wasser oder Kochsalzlösung, Alkylenglycole, wie Propylenglycol, Polyalkylenglycole, wie Polyethylenglycol, pflanzliche Öle, hydrierte Naphthaline und dergl. enthalten. Für die orale Verabreichung kann die Zubereitung durch Zugabe von Gallensäuresalzen oder Acylcarnitinen verstärkt werden. Zubereitungen für die nasale Verabreichung können fest sein und Träger, z. B. Lactose oder Dextran, enthalten, oder sie können in Form von wässrigen oder öligen Lösungen zur Verwendung in Form von Nasentropfen oder dosierbaren Sprays vorliegen. Für die bukkale Verabreichung enthalten typische Träger Zucker, Calciumstearat, Magnesiumstearat, vorgelatinierte Stärke und dergl.

[0090] Bei der Zubereitung für die nasale Verabreichung kann die Resorption durch die Nasenschleimhaut durch oberflächenaktive Säuren, z. B. Glycocholsäure, Cholsäure, Taurocholsäure, Ethocholsäure, Desoxycholsäure, Chenodesoxycholsäure, Dehydrocholsäure, Glycodesoxycholsäure, Cyclodextrine und dergl., in Mengen im Bereich von etwa 0,2 bis 15 Gew.-%, vorzugweise von etwa 0,5 bis 4 Gew.-%, insbesondere von etwa 2 Gew.-% verstärkt werden.

[0091] Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Verbindugnen an Personen über längere Zeiträume hinweg, z. B. für eine Woche bis zu einem Jahr, kann durch eine einzige Verabreichung eines Systems mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung, die eine für die gewünschte Freisetzungsdauer ausreichende Wirkstoffmenge enthält, erfolgen. Verschiedene Systeme zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung, wie monolithische oder Reservoir-Mikrokapseln, Depotimplantate, osmotische Pumpen, Vesikel, Mizellen, Liposomen, transdermale Pflaster, iontophoretische Vorrichtungen und alternative injizierbare Dosierungsformen können für diesen Zweck herangezogen werden. Die Lokalisierung der Stelle, an der die Abgabe des Wirkstoffes angestrebt wird, stellt ein weiteres Merkmal von einigen Vorrichtungen zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung dar, die sich bei der Behandlung bestimmter Störungen als günstig erweisen können.

[0092] Eine Form der Zubereitung zur kontrollierten Freisetzung enthält das Polypeptid und ein Salz davon in Dispersion oder Einkapselung in einem langsam abbaubaren, nicht-toxischen, nicht-antigenen Polymeren, wie Copoly-(Milchsäure/Glycolsäure), wie in den grundlegenden Arbeiten von Kent, Lewis, Sanders und Tice beschrieben ist (US-4 675 189). Die Verbindungen oder vorzugsweise ihre relativ unlöslichen Salze können auch in Pellets in Cholesterin oder einer anderen Lipidmatrix oder in Silastomer-Matriximplantaten zubereitet werden. Weitere Depotimplantate oder injizierbare Zubereitungen mit langsamer Wirkstofffreisetzung sind für den Fachmann ersichtlich. Es wird beispielsweise auf "Sustalned and Controlled Release Drug Delivery Systems", Herausgeber J. R. Robinson, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, und "Controlled Release of Biologically Active Agents", R. W. Baker, John Wiley & Sons, New York, 1987, verwiesen.

[0093] Die folgenden speziellen Beispiele erläutern die Herstellung und das Testen von repräsentativen erfindungsgemäßen Verbindungen und sind nicht als Beschränkung des Schutzumfangs der Erfindung anzusehen. In den Beispielen bedeutet "F" den Schmelzpunkt, "$[\alpha]_D25$" die optische Aktivität bei 25°C bei der angegebenen

Konzentration im angegebenen Lösungsmittel, "FAB" Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie, und "AAA" Aminosäureanalyse, wobei die erwarteten Werte in Klammern im Anschluß an die beobachteten Werte angegeben sind. Die Aminosäureanalysen wurden mit einem Hewlett-Packard-AminoQuant-Analyzer gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Primäre Aminosäuren wurden mit o-Phthalaldehyd und sekundäre Aminosäuren mit Fmoc derivatisiert. Der Fluoreszenznachweis der derivatisierten Aminosäuren wurde für die quantitative Bestimmung herangezogen. Die geschützten Aminosäuren wurden von der Firma Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA) bezogen.

Beispiel I

[0094] Die Verbindung I (SEQ ID NO: 7) wurde in einer Menge von 0,5 mmol durch das Festphasenverfahren an 4-Methylbenzhydrylaminharz unter Verwendung des automatisierten Peptidsynthesegeräts der Firma Applied Biosystems, Modell 430A, hergestellt. Die α-Aminogruppen wurden mit tert.-Butoxycarbonyl (Boc) geschützt. Bei den Seitenkettenschutzgruppen handelte es sich um: Benzyl (Bzl) für Asp, Glu und Ser; Tosyl (Tos) für Arg; Benzyloxymethyl (Bom) für His; und 2-Chlorbenzyl (Cl-z) für Lys. Die Aminosäuren wurden sequenziell unter Verwendung von N,N-Dicyclohexylcarbodiimid/1-Hydroxybenzotriazol (DCC/HOBt) gemäß den Angaben von Stewart und Young (a.a.O.) gekuppelt. Nach jeder Aminosäurekupplung wurde das Peptid unter Verwendung eines Gemisches aus Essigsäureanhydrid und Diisopropylethylamin in N-Methylpyrrolidon acetyliert. Das vollständige Peptid wurde vom Harz unter gleichzeitiger Schutzgruppenentfernung der Seitenketten-Schutzgruppen unter Verwendung von wasserfreiem HF (25 ml) in Gegenwart von Anisol (2,5 ml) für 30 Minuten bei –10°C und für 60 Minuten bei 0°C gespalten. Nach Abdampfen des HF unter Vakuum wurde der Rückstand mit wasserfreiem Ether gewaschen. Das rohe Peptid wurde mit 10% Essigsäure extrahiert. Durch Lyophilisation des Extrakts mit 10% Essigsäure erhielt man 900 mg Rohprodukt. Das Peptid wurde durch Mitteldruck-ODS-Umkehrphasen-Säulenchromatographie unter Verwendung eines Gradienten von 22-45% CH_3CN in 0,1% Trifluoressigsäure gereinigt. Das Produkt wurde in drei Fraktionen eluiert, die eingeengt und lyophilisiert wurden. Man erhielt 130 mg eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von >98%.

Verbindung 1:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLEKLHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 7)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys

20 25 30

Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO:7)

[0095] physikalische Daten: F. 150–159°C $[\alpha]_D^{25}$ –34,88° (c 0,16, H_2O)
FAB ($C_{175}H_{300}N_{56}O_{51}$): $[M + H]^+$ 4005,5
AAA: Asp, 1,9 (2); Glu, 5,6 (6); Ser, 1,6 (2); His, 2,7 (3); Gly, 1,0 (1); Thr, 0,9 (1); Ala, 1,9 (2); Arg, 2,8 (3); Val; 1,0 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,3 (8); Lys, 4,0 (4).
[0096] Gleichermaßen wurden die Verbindungen 2, 5-18; 21-27, 29-36, 38-48, 50-54, 58-64 und 66-70 hergestellt und charakterisiert, wobei nach Bedarf substituiertes PAM-Harz für die Synthese der hydroxyterminalen Polypeptide verwendet wurde.

Verbindung 2:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLEKLHTA-OH (SEQ ID NO: 6)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys

20 25 30

Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO:6)

[0097] physikalische Daten: F. 154–170°C $[\alpha]_D^{25}$ –49,35° (c 0,46, H_2O)
FAB ($C_{175}H_{301}N_{57}O_{50}$): $[M + H]^+$ 4005,0

AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 5,9 (6); Ser, 1,7 (2); His, 2,9 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 1,9 (2); Arg, 3,0 (3); Val, 1,2 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 7,8 (8); Lys, 4,2 (4).

Verbindung 5:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLERLLERLHTA-OH (SEQ ID NO: 15)

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 Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg

20 25 30

Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO:15)

[0098] physikalische Daten: F. 147–165°C $[\alpha]_D^{25}$ –49,17° (c 0,66, H_2O)
FAB ($C_{175}H_{299}N_{59}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4061
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 6,1 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,1 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 5,0 (5); Val, 1,0 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,7 (8); Lys, 1,9 (2).

Verbindung 6:

AVSEHQLLHDRGRSIQDLRRRELLERLLERLHTA-OH (SEQ ID NO: 16)

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

1 5 10 15

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg

20 25 30

Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 16)

[0099] physikalische Daten: F. 150–170°C $[\alpha]_D^{25}$ –48,65° (c 0,54, H_2O)
FAB ($C_{175}H_{299}N_{63}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4118,0
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 6,1 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,2 (3); Gly, 1,2 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 6,9 (7); Val, 1,0 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 7,8 (8).

Verbindung 7:

AVSEHQLLHDRGRSIQDLRRRELLERLLKRLHTA-OH (SEQ ID NO: 17)

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

1 5 10 15

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Lys Arg

20 25 30

Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 17)

[0100] physikalische Daten: F. 177–182°C $[\alpha]_D^{25}$ –46,17° (c 0,14, H_2O)
FAB ($C_{176}H_{304}N_{64}O_{50}$): $[M + H]^+$ 4117
AAA: Asp, 2,0 (2); Glu, 4,8 (5); Ser, 1,8 (2); His, 3,2 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 0,9 (1); Ala, 1,9 (2); Arg, 6,7 (7); Val, 1,0 (1); Ile, 1,0 (1); Lys, 7,7 (8); Lys, 0,9 (1).

Verbindung 8:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLRKLHTA-OH (SEQ ID NO: 5)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Arg Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 5)

[0101] physikalische Daten: F. 147–165°C $[\alpha]_D^{25}$ –49,17° (c 0,66, H_2O)
FAB ($C_{176}H_{305}N_{59}O_{49}$): $[M + H]^+$ 4033,0
AAA: Asp, 2,0 (2); Glu, 4,8 (5); Ser, 1,8 (2); His, 2,7 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 0,9 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,9 (4); Val, 1,0 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 7,9 (8); Lys, 4,0 (4).

Verbindung 9:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLEKLHTAGRR-OH (SEQ ID NO: 10)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala Gly Arg Arg OH (SEQ ID NO: 10)

[0102] physikalische Daten: F. 158–160°C $[\alpha]_D^{25}$ –44,76° (c 0,1, H_2O)
FAB ($C_{189}H_{326}N_{64}O_{55}$): $[M]^+$ 4375,0
AAA: Asp, 2,0 (2); Glu, 5,9 (6); Ser, 1,7 (2); His, 2,9 (3); Gly, 2,3 (2); Thr, 1,0 (1); Ala, 1,9 (2); Arg, 5,0 (5); Val, 1,2 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 7,8 (8); Lys, 4,3 (4).

Verbindung 10:

AVSEAOLLHDLGKSIQDLRRRELLEKLLEKLHAL-OH (SEQ ID NO: 14)

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

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Ala Leu OH (SEQ ID NO: 14)

[0103] physikalische Daten: F. 170–175°C $[\alpha]_D^{25}$ –31,59° (c 0,54, H_2O)
FAB ($C_{174}H_{300}N_{52}O_{51}$): $[M + H]^+$ 3936,0
AAA: Asp, 2,0 (2); Glu, 6,0 (6); Ser, 1,8 (2); His, 2,0 (2); Gly, 1,2 (1); Ala, 3,0 (3); Arg, 2,8 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 9,9 (10); Lys, 3,0 (3).

Verbindung 11:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLELLKEL-NH_2 (SEQ ID NO: 11)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu Lys Glu Leu NH_2 (SEQ ID NO: 11)

[0104] physikalische Daten: F. 172–174°C $[\alpha]_D^{25}$ –43,29° (c 0,2, H_2O)
FAB ($C_{179}H_{311}N_{55}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4065,8
AAA: Asp, 2,2 (2); Glu, 7,7 (7); Ser, 1,7 (2); His, 2,0 (2); Gly, 1,0 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 3,0 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 9,3 (9); Lys, 5,1 (5).

Verbindung 12:

AVSEIOFXHNLGKHLSSXERVELLEKLLEKLHNY-NH_2 (X=Nle, SEQ ID NO: 23)

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Nle His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Nle Glu Arg Val Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Asn Tyr NH_2 (SEQ ID NO: 23)

[0105] physikalische Daten: F. 178°C $[\alpha]_D^{25}$ –36,88° (c 0,4, H_2O)
FAB ($C_{182}H_{295}N_{50}O_{51}$): $[M + H]^+$ 4001,6
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 6,5 (6); Ser, 2,7 (3); His, 3,1 (3); Gly, 1,1 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 1,0 (1); Tyr, 0,8 (1), Val, 2,0 (2); Phe, 1,0 (1), Ile, 0,9 (1); Leu + Nle, 8,5 (7 + 2); Lys, 3,1 (3).

Verbindung 13:

AVSEIOFXHNLGKHLSSXRRRELLEKLLEKLHNY-NH_2 (X=Nle, SEQ ID NO: 24)

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Nle His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Nle Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Asn Tyr NH_2 (SEQ ID NO: 24)

[0106] physikalische Daten: F. 260°C $[\alpha]_D^{25}$ –37,02° (c 0,2, H_2O)
FAB ($C_{184}H_{304}N_{56}O_{49}$): $[M + H]^+$ 4084
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 5,5 (5); Ser, 2,6 (3); His, 3,1 (3); Ala, 1,0 (1); Gly, 1,1 (1); Arg, 3,2 (3); Tyr, 1,0 (1), Val, 1,0 (1); Phe, 1,0 (1), Ile, 1,0 (1); Leu, 9,0 (9); Lys, 3,0 (3).

Verbindung 14:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRALAEALAEALHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 20)

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 Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 20)

[0107] physikalische Daten: F. 190–225°C $[\alpha]_D^{25}$ –56,58° (c 0,36, H_2O)
FAB ($C_{161}H_{272}N_{54}O_{49}$): $[M + H]^+$ 3747,0
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 4,9 (5); Ser, 1,7 (2); His, 2,6 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 7,6 (7); Arg, 2,8 (3); Val, 1,2 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 6,6 (6); Lys, 1,9 (2).

Verbindung 15:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLARRELLEKLLEKLHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 12)

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 12)

[0108] physikalische Daten: F. 170–180°C $[\alpha]_D^{25}$ –48,19° (c 0,2, H_2O)
FAB ($C_{172}H_{293}N_{53}O_{51}$): $[M + H]^+$ 3919,0
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 6,1 (6); Ser, 1,7 (2); His, 3,1 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 3,0 (3); Arg, 2,1 (2); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,0 (8); Lys, 4,4 (4).

Verbindung 16:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRAELLEKLLEKLHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 13)

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Arg Arg Ala Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 13)

[0109] physikalische Daten: F. 190–195°C $[\alpha]_D^{25}$ –50,50° (c 0,4, H_2O)
FAB ($C_{172}H_{293}N_{53}O_{51}$): $[M + H]^+$ 3919,0
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 6,0 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,1 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 3,0 (3); Arg, 2,1 (2); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 7,5 (8); Lys, 4,2 (4).

Verbindung 17:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRSLLSSLLSSLHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 21)

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 Ser Leu Leu Ser Ser Leu Leu Ser Ser
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 21)

[0110] physikalische Daten: F. 195–204°C $[\alpha]_D^{25}$ –67,11° (c 0,3, H_2O)
FAB ($C_{163}H_{280}N_{54}O_{50}$): $[M + H]^+$ 3796,0
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 2,9 (3); Ser, 6,8 (7); His, 3,1 (3); Gly, 1,2 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,0 (3); Val, 1,0 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,2 (8); Lys, 2,0 (2).

Verbindung 18:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRAFYDKVAEKLHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 22)

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 Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 22)

[0111] physikalische Daten: F. 200–207°C $[\alpha]_D^{25}$ –60,26° (c 0,6, H_2O)
FAB ($C_{174}H_{284}N_{56}O_{50}$): $[M + H]^+$ 3960,0
AAA: Asp, 2,9 (3); Glu, 3,5 (4); Ser, 1,4 (2); His, 2,6 (3); Gly, 0,9 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 4,0 (4); Arg, 3,0 (3); Tyr, 0,9 (1); Val, 1,9 (2); Phe, 1,1 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 3,6 (4); Lys, 4,1 (4).

Verbindung 21:

AVSEIQFLHN LGKHLSSLRR RELLEKLLEK LHNY-NH_2 (SEQ ID NO: 35)

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Leu His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Asn Tyr NH_2 (SEQ ID NO: 35)

[0112] physikalische Daten: F. 148–155°C $[\alpha]_D^{25}$ –45,97° (c 0,26, H_2O)
FAB ($C_{184}H_{304}N_{56}O_{49}$): $[M + H]^+$ 4084
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 5,0 (5); Ser, 2,7 (3); His, 3,0 (3); Gly, 1,0 (1); Ala, 0,9 (1); Arg, 3,1 (3); Tyr, 0,9 (1); Val, 1,0 (1); Phe, 0,9 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 9,3 (9); Lys, 3,2 (3).

Verbindung 24:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLKL KELLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 38)

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Lys Leu Lys Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 38)

[0113] physikalische Daten: F. 175–182°C $[\alpha]_D^{25}$ –49,99° (c 0,47, H_2O)
FAB ($C_{175}H_{299}N_{49}O_{51}$): $[M + H]^+$ 3906,5
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 6,5 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,1 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,1 (2); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 9,1 (9); Lys, 6,5 (6).

Verbindung 25:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLERLLER LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 39)

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 Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg
20 25 30
Leu His Thr Ala-NH_2 (SEQ ID NO: 39)

[0114] physikalische Daten: F. 136,5–153,5°C $[\alpha]_D^{25}$ –32,57° (c 0,13, H_2O)
FAB ($C_{175}H_{300}N_{60}O_{51}$): $[M + H]^+$ 4060,8
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 6,2 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,2 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,1 (2); Arg, 5,2 (5); Val, 1,1 (1); Ile, 1,1 (1); Leu, 8,4 (8); Lys, 2,2 (2).

Verbindung 26:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLERLLER LHTAP-OH (SEQ ID NO: 40)

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 Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg
20 25 30
Leu His Thr Ala Pro OH (SEQ ID NO: 40)

[0115] physikalische Daten: F. 125,8–127,2°C $[\alpha]_D^{25}$ –54,62° (c. 0,23, H_2O)
FAB ($C_{180}H_{306}N_{60}O_{53}$): $[M + H]^+$ 4158,0
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 6,2 (6); Ser, 1,8 (2); His, 2,9 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 5,1 (5); Val, 1,0 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,0 (8); Lys, 2,1 (2); Pro, 1,1 (1).

Verbindung 27:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLERLLER LHTAGRR-OH (SEQ ID NO: 41)

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 Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg
20 25 30
Leu His Thr Ala Gly Arg Arg OH (SEQ ID NO: 41)
35

[0116] physikalische Daten: F. 106–137,3°C $[\alpha]_D^{25}$ –39,55° (c 0,67, H_2O)
FAB ($C_{189}H_{326}N_{68}O_{55}$): $[M + H]^+$ 4430,5
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 5,9 (6); Ser, 1,6 (2); His, 2,7 (3); Gly, 2,2 (2); Thr, 1,0 (1); Ala, 1,8 (2); Arg, 7,3 (7); Val, 0,8 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,1 (8); Lys, 2,1 (2).

Verbindung 29:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTY-NH_2 (SEQ ID NO: 43)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Tyr NH_2 (SEQ ID NO: 43)

[0117] physikalische Daten: F. 160–172°C $[\alpha]_D^{25}$ –49,85° (c 0,34, H_2O)
FAB ($C_{181}H_{304}N_{56}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4096,9
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,6 (6); Ser, 1,7 (2); His, 3,1 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 0,9 (1); Ala, 0,9 (1); Arg, 3,0 (3); Tyr, 0,9 (1); Val, 1,0 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 7,7 (8); Lys, 4,4 (4).

Verbindung 30:

AVSEHQLLHD KGYSIQDLRR RELLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 44)

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Tyr Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 44)

[0118] physikalische Daten: F. 130–171°C $[\alpha]_D^{25}$ –40,65° (c 0,34, H_2O)
FAB ($C_{178}H_{297}N_{55}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4039,4
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,5 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,4 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 2,9 (3); Tyr, 0,8 (1); Val, 1,0 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,9 (8); Lys, 3,4 (3).

Verbindung 31:

AVSEHQLLHD KGCSIQDLRR RELLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 45)

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Cys Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 45)

[0119] physikalische Daten:. F. 140–160°C $[\alpha]_D^{25}$ –44,48° (c 0,25, H_2O)
FAB ($C_{172}H_{293}N_{55}O_{51}S_1$): $[M + H]^+$ 3979
AAA: Asx + Cys, 3,0 (2 + 1); Glx, 5,6 (6); Ser, 1,7 (2); His, 3,0 (3); Gly, 1,0 (1); Thr, 0,9 (1); Ala, 1,9 (2); Arg, 2,5 (3); Val, 1,0 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,5 (8); Lys, 3,3 (3).

Verbindung 32:

AVSEHQLLHD KGXSIQDLRR RELLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 46)

(X = Cys($CH_2CONH(CH_2)_2NH$(biotinyl)))
Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Xaa Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (Xaa=Cys($CH_2CONH(CH_2)_2NH$(biotinyl))), (SEQ ID NO: 46)

[0120] physikalische Daten: F. nicht bestimmt $[\alpha]_D^{25}$ nicht bestimmt
FAB ($C_{186}H_{316}N_{59}O_{54}S_2$): $[M + H]^+$ 4306,6
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 6,1 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,8 (3); Gly, 1,0 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,1 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,3 (8); Lys, 3,3 (3).

Verbindung 33:

AVSEHQLLHD KGXSIQDLRR RELLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 47)

(X = Lys-(7-Dimethylamino-2-oxo-2H-1-benzopyran-4-acetyl))

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

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala NH_2 (Xaa = Lys-(7-Dimethylamino-2-oxo-2H-1-benzopyran-4-acetyl)) (SEQ ID NO: 47)

[0121] physikalische Daten: F. 135–205°C $[\alpha]_D^{25}$ –26,92° (c 0,104, 50% wässr. HOAc)
FAB ($C_{183}H_{311}N_{57}O_{54}$): $[M + H]^+$ 4233
AAA: Asx, 1,9 (2); Glx, 6,3 (6); Ser, 1,7 (2); His, 3,2 (3); Gly, 1,0 (1); Thr, 1,1 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,2 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,2 (8); Lys, 4,5 (4).

Verbindung 34:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTAG-OH (SEQ ID NO: 48)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala Gly OH (SEQ ID NO: 48)
35

[0122] physikalische Daten: F. 92,1–146,6°C $[\alpha]_D^{25}$ –40,76° (c 0,34, H_2O)
FAB ($C_{177}H_{302}N_{56}O_{53}$): $[M + H]^+$ 4062,0
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,7 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,0 (3); Gly, 2,2 (2); Thr, 0,9 (1); Ala, 1,9 (2); Arg, 2,8 (3); Val, 1,2 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,5 (8); Lys, 4,2 (4).

Verbindung 35:

AVSX_1HQLLHX_2 KGKSIQX_2LRR RX_1LLX_1KLLX_1K LHT-OH (SEQ ID NO: 49) (X_1 = Glu(OCH_3); X_2 = Asp(OCH_3))

Ala Val Ser Xaa_1 His Gln Leu Leu His Xaa_2 Lys Gly Lys Ser Ile
1 5 10 15

Gln Xaa_2 Leu Arg Arg Arg Xaa_1 Leu Leu Xaa_1 Lys Leu Leu Xaa_1 Lys
20 25 30

Leu His Ala OH (Xaa_1= Glu(OCH_3); Xaa_2 = Asp(OCH_3)) (SEQ ID NO: 49)

[0123] physikalische Daten: F. nicht bestimmt $[\alpha]_D^{25}$ –21,96° (c 0,132, H_2O)
FAB ($C_{181}H_{311}N_{55}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4089,0
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 6,3 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,3 (3);.Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,1 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,0 (8); Lys, 4,2 (4).

Verbindung 36:

AVSX_1HQLLHX_2 KGKSIQX_2LRR RX_1LLX_1KLLX_1K LHA-OCH_3 (SEQ ID NO: 50) (X_1 = Glu(OCH_3); X_2 = Asp(OCH_3))

Ala Val Ser Xaa_1 His Gln Leu Leu His Xaa_2 Lys Gly Lys Ser Ile
1 5 10 15
Gln Xaa_2 Leu Arg Arg Arg Xaa_1 Leu Leu Xaa_1 Lys Leu Leu Xaa_1 Lys
20 25 30
Leu His Ala OCH_3 (Xaa_1= Glu(OCH_3); Xaa_2 = Asp(OCH_3)) (SEQ ID NO: 50)

[0124] physikalische Daten: F. nicht bestimmt $[\alpha]_D^{25}$ –46,80° (c 0,07, H_2O)
FAB ($C_{182}H_{313}N_{55}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4103
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 6,2 (6); Ser, 1,4 (2); His, 3,0 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,1 (1); Ala, 1,7 (2); Arg, 3,2 (3); Val, 0,6 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,0 (8); Lys, 4,1 (4).

Verbindung 38:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTAP-OH (SEQ ID NO: 52)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala Pro OH (SEQ ID NO: 52)
35

[0125] physikalische Daten: F. 152,1–186,5°C $[\alpha]_D^{25}$ –55,91° (c 0,33, H_2O)
FAB ($C_{180}H_{306}N_{56}O_{53}$): $[M + H]^+$ 4102,6
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,6 (6); Ser, 1,7 (2); His, 2,9 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 0,9 (1); Ala, 1,9 (2); Arg, 2,9 (3); Val, 1,2 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 7,7 (8); Lys, 4,3 (4).

Verbindung 39:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTP-OH (SEQ ID NO: 53)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Pro OH (SEQ ID NO: 53)

[0126] physikalische Daten: F. 120–148,2°C $[\alpha]_D^{25}$ –52,78° (c 0,47, H_2O)
FAB ($C_{177}H_{301}N_{55}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4031,0
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,5 (6); Ser, 1,8 (2); His, 2,9 (3); Gly, 1,0 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 0,9 (1); Arg, 2,9 (3); Val, 1,2 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,5 (8); Lys, 3,6 (3); Pro, 0,9 (1).

Verbindung 40:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTP-NH_2 (SEQ ID NO: 54)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Pro NH_2 (SEQ ID NO: 54)

[0127] physikalische Daten: F. 133,9–155,1°C $[\alpha]_D^{25}$ –54,22° (c 0,37, H_2O)

FAB ($C_{177}H_{302}N_{56}O_{51}$): $[M + H]^+$ 4030,7
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,6 (6); Ser, 1,9 (2); His, 2,9 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 0,9 (1), Ala, 0,9 (1); Arg, 2,8 (3); Val, 1,2 (1); Ile, 1,1 (1); Leu, 7,8 (8); Lys, 4,2 (4); Pro, 0,9 (1).

Verbindung 41:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHP-NH_2 (SEQ ID NO: 55)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Pro NH_2 (SEQ ID NO: 55)

[0128] physikalische Daten: F. 142,8–166,1°C $[\alpha]_D^{25}$ –53,80° (c 0,38, H_2O)
FAB ($C_{173}H_{295}N_{55}O_{49}$): $[M + H]^+$ 3929
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,7 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,0 (3); Gly, 1,1 (1); Ala, 0,9 (1); Arg, 2,8 (3); Val, 1,2 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,4 (8); Lys, 4,4 (4); Pro, 0,9 (1).

Verbindung 42:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LP-NH_2 (SEQ ID NO: 56)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu Pro NH_2 (SEQ ID NO: 56)

[0129] physikalische Daten: F. 161,0–177,0°C $[\alpha]_D^{25}$ –61,97° (c 0,19, H_2O)
FAB ($C_{167}H_{288}N_{52}O_{48}$): $[M + H]^+$ 3792,0
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 5,9 (6); Ser, 1,9 (2); His, 2,1 (2); Gly, 1,1 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 3,0 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 7,9 (8); Lys, 4,3 (4); Pro, 0,9 (1).

Verbindung 43:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTRSAW-OH (SEQ ID NO: 57)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Arg Ser Ala Trp OH (SEQ ID NO: 57)
35

[0130] physikalische Daten: F. 181–202°C $[\alpha]_D^{25}$ –45,14° (c 0,19, H_2O)
FAB ($C_{195}H_{326}N_{62}O_{56}$): $[M + H]^+$ 4435,2
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5.,8 (6); Ser, 2,8 (3); His, 2,8 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 0,9 (1), Ala, 1,9 (2); Arg, 3,7 (4); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,5 (8); Lys, 4,3 (4); Trp, 0,9 (1).

Verbindung 44:

AVSEHQLLHD RGRSIQDLRR RELLERLLER LHTAGRRTRSAW-OH (SEQ ID NO: 58)

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Arg Gly Arg Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg
20 25 30
Leu His Thr Arg Gly Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp OH (SEQ ID NO: 58)
35 40

[0131] physikalische Daten: F. 130–132,2°C $[\alpha]_D^{25}$ –46,66° (c 0,195, H_2O)
FAB ($C_{216}H_{365}N_{81}O_{62}$): $[M + H]^+$ 5088,8
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 6,0 (6); Ser, 2,7 (3); His, 3,0 (3); Gly, 2,2 (2); Thr, 2,1 (2), Ala, 3,0 (3); Arg, 10,5 (10); Val, 0,9 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,2 (8); Trp, 1,0 (1).

Verbindung 45:

AVSEHQLLHD RGRSIQDLRR RELLERLLER LHTAGRRTRSAW-NH_2 (SEQ ID NO: 59)

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Arg Gly Arg Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg
20 25 30
Leu His Thr Arg Gly Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp NH_2 (SEQ ID NO: 59)
35 40

[0132] physikalische Daten: F. 158–174°C $[\alpha]_D^{25}$ –43,57° (c 0,53, H_2O)
FAB ($C_{216}H_{366}N_{82}O_{61}$): $[M + H]^+$ 5087,4
AAA: Asx, 1,9 (2); Glx, 5,6 (6); Ser, 2,6 (3); His, 3,3 (3); Gly, 2,1 (2); Thr, 2,0 (2); Ala, 2,9 (3); Arg, 10,1 (10); Val, 0,9 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,3 (8); Trp, 1,1 (1).

Verbindung 46:

AVSEHQLLHD RGXSIQDLRR RELLERLLER LHTAGRRTRSAW-OH (SEQ ID NO: 60)

(X = Lys(dihydrocinnamoyl))

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Arg Gly Xaa Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg
20 25 30
Leu His Thr Arg Gly Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp OH
35 40

(Xaa = Lys(dihydrocinnamoyl)), (SEQ ID NO: 60)

[0133] physikalische Daten: F. 165,4–175,2°C $[\alpha]_D^{25}$ –40,43° (c 0,20, H_2O)
FAB ($C_{225}H_{374}N_{80}O_{62}$): $[M + H]^+$ 5191

AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 6,3 (6); Ser, 2,8 (3); His, 3,2 (3); Gly, 2,1 (2); Thr, 2,0 (2), Ala, 3,2 (3); Arg, 9,9 (9); Val, 1,0 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,6 (8); Lys, 1,1 (1); Trp, 1,1 (1).

Verbindung 47:

AVSEIQFXHN LGKHLSSXTR SAWLRKKLQD VHNY-NH_2 (SEQ ID NO: 61)

X = Norleucin

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Nle His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15

Ser Ser Nle Thr Arg Ser Ala Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp
20 25 30

Val His Asn Tyr NH_2 (SEQ ID NO: 61)

[0134] physikalische Daten: F. 140–160°C $[\alpha]_D^{25}$ –56,88° (c 0,16, H_2O)
FAB ($C_{180}H_{287}N_{55}O_{58}$): $[M + H]^+$ 3989,8
AAA: Asx, 3,0 (3); Glx, 2,9 (3); Ser, 3,7 (4); His, 2,8 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 0,9 (1), Ala, 1,9 (2); Arg, 2,0 (2); Tyr, 1,0 (1); Val, 1,7 (2); Phe, 0,9 (1); Ile, 0,9 (1); Leu + Nle, 5,8 (2 + 4); Lys, 3,4 (3); Trp, 1,1 (1).

Verbindung 48:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTMA-NH_2 (SEQ ID NO: 62)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Met Ala NH_2 (SEQ ID NO: 62)
35

[0135] physikalische Daten: F. 140–210°C $[\alpha]_D^{25}$ –47,75° (c 0,178, H_2O)
FAB ($C_{180}H_{309}N_{57}O_{52}S_1$): $[M + H]^+$ 4135,0
AAA: Asx, 2,3 (2); Glx, 6,6 (6); Ser, 1,4 (2); His, 3,2 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,1 (3); Val, 0,9 (1); Met, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,8 (8); Lys, 4,4 (4).

Verbindung 50:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RFFLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 64)

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 Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 64)
35

[0136] physikalische Daten: F. 136,5–156,8°C $[\alpha]_D^{25}$ –49,89° (c 0,24, H_2O)
FAB ($C_{182}H_{300}N_{56}O_{49}$): $[M + H]^+$ 4056,0
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 5,0 (5); Ser, 1,9 (2); His, 3,3 (3); Gly, 1,0 (1); Thr, 1,0 (1), Ala, 2,1 (2); Arg, 3,1 (3); Val, 1,0 (1); Phe, 2,0 (2); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,2 (7); Lys, 3,5 (4).

Verbindung 51:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLHKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 65)

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 Glu Leu Leu His Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 65)

[0137] physikalische Daten: F. 80,7–141,0°C $[\alpha]_D^{25}$ –55,38° (c 0,23, H_2O)
FAB ($C_{176}H_{300}N_{58}O_{49}$): $[M + H]^+$ 4012,8
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 4,9 (5); Ser, 1,8 (2); His, 4,3 (4); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2, 0 (2); Arg, 3,1 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,1 (8); Lys, 3, 9 (4).

Verbindung 52:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEHLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 66)

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 Glu Leu Leu Glu His Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 66)

[0138] physikalische Daten: F. 134,3–157,9°C $[\alpha]_D^{25}$ –50,72° (c 0,45, H_2O)
FAB ($C_{175}H_{295}N_{57}O_{51}$): $[M + H]^+$ 4012,8
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 5,9 (6); Ser, 1,8 (2); His, 4,2 (4); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,0 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,1 (8); Lys, 3,1 (3).

Verbindung 53:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLIAK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 67)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Ile Ala Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 67)

[0139] physikalische Daten: F. 142,7–159,8°C $[\alpha]_D^{25}$ –54,01° (c 0,21, H_2O)
FAB ($C_{173}H_{298}N_{56}O_{49}$): $[M + H]^+$ 3946,0
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 4,9 (5); Ser, 1,8 (2); His, 3,1 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,1 (1); Ala, 3,1 (3); Arg, 3,1 (3); Val, 1,0 (1); Ile, 1,9 (2); Leu, 7,0 (7); Lys, 4,3 (4).

Verbindung 54:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEE IHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 68)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Glu
20 25 30
Ile His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 68)

[0140] physikalische Daten: F. 138–185°C $[\alpha]_D^{25}$ –50,17° (c 0,14, H_2O)
FAB ($C_{174}H_{295}N_{55}O_{53}$): $[M + H]^+$ 4005
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 7,1 (7); Ser, 1,7 (2); His, 2,8 (3); Gly, 1,0 (1); Thr, 1,0 (1), Ala, 2,1 (2); Arg, 3,1 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 1,7 (2); Leu, 7,1 (7); Lys, 2,7 (3).

Verbindung 58:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTRSAW-NH_2 (SEQ ID NO: 72)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Arg Ser Ala Trp NH_2 (SEQ ID NO: 72)
35

[0141] physikalische Daten: F. 158–163°C $[\alpha]_D^{25}$ –46,06° (c 0,17, H_2O)
FAB ($C_{195}H_{327}N_{63}O_{55}$): $[M + H]^+$ 4434,8
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,5 (6); Ser, 2,7 (3); His, 3,1 (3); Gly, 1,0 (1); Ala, 1,8 (2); Arg, 4,0 (4); Thr, 0,9 (1); Val, 0,9 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,5 (8); Lys, 3,9 (4); Trp, 1,0 (1).

Verbindung 59:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTRSAX-OH (SEQ ID NO: 73 (X = Nal(2) = 3-(2-Napthyl)-L-alanin)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Arg Ser Ala 3-(2-Napthyl)-L-alanin-OH (SEQ ID NO: 73)
35

[0142] physikalische Daten: F. 156–162°C $[\alpha]_D^{25}$ –44,44° (c 0,189, H_2O)
FAB ($C_{197}H_{328}N_{62}O_{55}$): $[M + H]^+$ 4445,6
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 5,5 (6); Ser, 2,8 (3); His, 2,9 (3); Gly, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 4,0 (4); Thr, 0,9 (1); Val, 1,0 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,5 (8); Lys, 4,2 (4); Nal, 1,1 (1).

Verbindung 60:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTASAW-OH (SEQ ID NO: 74)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala Ser Ala Trp OH (SEQ ID NO: 74)
35

[0143] physikalische Daten: F. 159–164°C $[\alpha]_D^{25}$ –50,94° (c 0,29, H_2O)
FAB ($C_{192}H_{320}N_{60}O_{55}$): $[M + H]^+$ 4349,0

AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,6 (6); Ser, 2,7 (3); His, 3,2 (3); Gly, 1,0 (1); Ala, 3,1 (3); Arg, 2,8 (3); Thr, 1,0 (1); Val, 1,1 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,6 (8); Lys, 4,0 (4); Trp, 1,0 (1).

Verbindung 61:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTAEIRA-OH (SEQ ID NO: 75)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala Glu Ile Arg Ala OH (SEQ ID NO: 75)
35

[0144] physikalische Daten: F. 155–210°C $[\alpha]_D^{25}$ –46,15° (c 0,12, H_2O)
FAB ($C_{195}H_{334}N_{62}O_{58}$): $[M + H]^+$ 4475,8
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 6,9 (7); Ser, 1,7 (2); His, 3,2 (3); Gly, 1,1 (1); Ala, 3,1 (3); Arg, 4,0 (4); Thr, 0,9 (1); Val, 1,1 (1); Ile, 1,9 (2); Leu, 8,1 (8); Lys, 4,1 (4).

Verbindung 62:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTAEIR-OH (SEQ ID NO: 76)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala Glu Ile Arg OH (SEQ ID NO: 76)
35

[0145] physikalische Daten: F. 186–218°C $[\alpha]_D^{25}$ –52,73° (c 0,265, H_2O)
FAB ($C_{192}H_{329}N_{61}O_{57}$): $[M + H]^+$ 4404,4
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 6,6 (7); Ser, 1,9 (2); His, 3,4 (3); Gly, 1,1 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,8 (4); Thr, 1,0 (1); Val, 1,1 (1); Ile, 1,7 (2); Leu, 7,9 (8); Lys, 4,0 (4).

Verbindung 63:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTAEI-OH (SEQ ID NO: 77)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala Glu Ile OH (SEQ ID NO: 77)
35

[0146] physikalische Daten: F. 169–205°C $[\alpha]_D^{25}$ –50,78° (c 0,51, H_2O)
FAB ($C_{186}H_{317}N_{57}O_{56}$): $[M + H]^+$ 4248,0
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 6,8 (7); Ser, 1,8 (2); His, 3,3 (3); Gly, 1,0 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,0 (3); Thr, 1,0 (1); Val, 1,0 (1); Ile, 1,8 (2); Leu, 7,8 (8); Lys, 3,6 (4).

Verbindung 64:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTAE-OH (SEQ ID NO: 78)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr Ala Glu OH (SEQ ID NO: 78)
35

[0147] physikalische Daten: F. 199–205°C $[\alpha]_D^{25}$ –52,47° (c 0,41, H_2O)
FAB ($C_{180}H_{306}N_{56}O_{55}$): $[M + H]^+$ 4135,0
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 6,6 (7); Ser, 1,9 (2); His, 3,3 (3); Gly, 1,1 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 2,9 (3); Thr, 1,0 (1); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,2 (8); Lys, 3,8 (4).

Verbindung 66:

SEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 80)

Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp
1 5 10 15
Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30
Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 80)

[0148] physikalische Daten: F. 134,2°C $[\alpha]_D^{25}$ –48,12° (c 0,36, H_2O)
FAB ($C_{167}H_{286}N_{54}O_{49}$): $[M + H]^+$ 3834,4
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,7 (6); Ser, 1,7 (2); His, 2,9 (3); Gly, 1,0 (1); Thr, 0,9 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 2,8 (3); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,4 (8); Lys, 4,3 (4).

Verbindung 67:

LLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 81)

Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg
1 5 10 15

Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 81)
20 25

[0149] Physikalische Daten: F. 128,5–184,5°C $[\alpha]_D^{25}$ –6,53 (c 0,69, MeOH)
FAB($C_{148}H_{259}N_{47}O_{41}$): $[M + H]^+$ 3353
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 4,1 (4); Ser, 0,9 (1); His, 2,1 (2); Gly, 1,0 (1); Thr, 0,9 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 3,0 (3); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,1 (8); Lys, 4,2 (4).

Verbindung 68:

LHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO:82)

Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu
1 5 10 15
Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala NH2 (SEQ ID NO:82)
20 25

[0150] Physikalische Daten: F. 165–210°C $[\alpha]_D^{25}$ –36,05(c 0,12, H_2O)
FAB($C_{142}H_{248}N_{46}O_{40}$): $[M + H]^+$ 3239,0
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 3,9 (4); Ser, 0,9 (1); His, 1,9 (2); Gly, 1,0 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 2,9 (3); Ile, 0,9 (1); Leu, 6,8 (7); Lys, 4,2 (4).

Verbindung 69:

SEHQLLHD RGRSIQDLRR RELLERLLER LHAGRRTRSAW-OH (SEQ ID NO: 83)

Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Arg Gly Arg Ser Ile Gln Asp
1 5 10 15
Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His
20 25 30
Leu His Arg Gly Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp OH (SEQ ID NO: 83)
35 40

[0151] physikalische Daten: F. 150–210°C $[\alpha]_D^{25}$ –18,0° (c 0,64, H_2O)
FAB ($C_{208}H_{351}N_{79}O_{60}$): $[M + H]^+$ 4918,6
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 6,2 (6); Ser, 2,8 (3); His, 3,1 (3); Gly, 2,2 (2); Thr, 2,2 (2); Ala, 2,2 (2); Arg, 10,4 (10); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,0 (8); Trp, 1,1 (1).

Verbindung 70:

LLHD RGRSIQDLRR RELLERLLER LHAGRRTRSAW-OH (SEQ ID NO: 84)

Leu Leu His Asp Arg Gly Arg Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg
1 5 10 15
Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His Leu His Arg Gly
20 25 30
Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp OH (SEQ ID NO: 84)
35

[0152] physikalische Daten: F. 150–210°C $[\alpha]_D^{25}$ –41,70° (c 0,36, H_2O)
FAB ($C_{189}H_{324}N_{72}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4437,14
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 4,1 (4); Ser, 1,9 (2); His, 2,0 (2); Gly, 2,1 (2); Thr, 2,0 (2); Ala, 2,1 (2); Arg, 9,7 (10); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,4 (8).
[0153] Das cyclisierte Seitenkettenanaloge (Verbindung 57) wurde auf die vorstehende Weise synthetisiert, mit der Ausnahme, dass N^{α}-Boc-N^{ε}-Fmoc-Lys und N^{α}-Boc-N^{γ}-Fmoc-Asp in den Positionen 13 bzw. 17 platziert wurden. Nach Beendigung der Boc-Aminosäuresynthese wurden die Harze 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 20% Piperidin in DMF behandelt. Das Harz wurde filtriert und mit DMF, MeOH und CH_2Cl_2 gewaschen. Sodann wurde das Harz (1,1 g) in 10 ml DMF mit einem Gehalt an 250 mg PyBOP suspendiert. Der pH-Wert wurde mit DIEA auf 8-9 eingestellt. Das Harz wurde 1 Stunde gerührt. Sodann wurde das Harz filtriert, mit DMF und CH_2Cl_2 gewaschen und anschließend in DMF resuspendiert. Die Kupplung wurde unter Verwendung von 125 mg PyBOP wiederholt. Das Harz wurde filtriert, mit DMF, MeOH und CH_2Cl_2 gewaschen und getrocknet. Sodann wurde das Harz mit HF behandelt. Das Peptid wurde auf die vorstehend angegebene Weise gereinigt.

Verbindung 57:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTA-NH_2 (SEQ ID NO: 71)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr Ala NH_2 (SEQ ID NO: 71)

[0154] physikalische Daten: F. 142,5–163,5°C $[\alpha]_D^{25}$ –34,31 ° (c 0,17, H_2O)
FAB ($C_{175}H_{298}N_{56}O_{50}$): $[M + H]^+$ 3986,4
AAA: Asx, 1,9 (2); Glx, 5,9 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,2 (3); Gly, 1,1 (1); Ala, 2,0 (2); Arg, 3,0 (3); Thr, 1,0 (1); Val, 1,1 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,0 (8); Lys, 4,0 (4).

Beispiel II

[Met^{34}, Ala^{35}]-Verbindung 1,

[0155] AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLEKLHTMA-NH_2, (SEQ ID NO: 25) wurde gemäß dem Verfahren von Beispiel I hergestellt und gereinigt. Dieses Polypeptid wurde auf folgende Weise in das Homoserin-lacton umgewandelt. Das gereinigte Peptid (160 mg) wurde in 44% Ameisensäure (4 ml) gelöst. Diese Lösung wurde mit einer vorgemischten Lösung von Bromcyan (700 mg) und Phenol (1,6 mg) in 44% Ameisensäure (4 ml) bei 0°C vereinigt. Die Lösung wurde 2 Stunden bei 0°C und sodann 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Bildung des Produkts wurde durch HPLC überwacht (Vydac® C-18, 300 Å, 4,6 × 250 mm, Strömungsgeschwindigkeit 1,2 ml/min, Gradient 25-45% Acetonitril in 0,1 Trifluoressigsäure innerhalb von 10 min). Die Umsetzung war innerhalb von 4 Stunden vollständig. Die Hälfte der Probe wurde eingeengt und durch präparative RP-HPLC gereinigt (Vydac® C-18, Gradient 25-45% Acetonitril in 0,1%. TFA). Die Homoserin-lacton-Peptidfraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Man erhielt 28 mg der Verbindung 4 in Form eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von >95%.

Verbindung 4:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLEKLHTX (X = hSerlac) (SEQ ID NO: 9)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30

Leu His Thr hSerlac (SEQ ID NO: 9)

[0156] physikalische Daten: F. 138–142°C $[\alpha]_D^{25}$ –50,66° (c 0,1, H_2O)
FAB ($C_{176}H_{299}N_{55}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4017,61
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 6,1 (6); Ser, 1,8 (2); His, 3,0 (3); Thr, 1,1 (1); Ala, 1,1 (1); Arg, 2,7 (3); Val, 1,0 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,2 (8); Lys, 3,8 (4); Gly 1,09 (1); hSer, 1,09 (1).
[0157] Gleichermaßen wurde die Verbindung 65 gemäß diesem Verfahren hergestellt.

Verbindung 65:

AVSEIQFX$_1$HN KGKHLSSX$_1$ER VEWLRKKLQD VHNX$_2$ (SEQ ID NO: 79)

(X$_1$ = L-Norleucin; X$_2$ = Homoserinlacton)

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Nle His Asn Lys Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Nle Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp
20 25 30
Val His Asn hSerlac (SEQ ID NO: 79)

[0158] physikalische Daten: F. 166–176°C $[\alpha]_D^{25}$ –52,22° (c 0,25, H_2O)
FAB ($C_{180}H_{288}N_{54}O_{50}$): $[M + H]^+$ 4008,6
AAA: Asx, 3,1 (3); Glx, 4,8 (5); Ser, 2,9 (3); His, 2,9 (3); Gly, 1,1 (1); Ala, 1,1 (1); Arg, 2,0 (2); Val, 2,7 (3); Phe, 1,0 (1); Ile, 1,0 (1); Leu + Nle, 5,9 (4 + 2); Lys, 2,8 (3).

Beispiel III

[0159] Zur Herstellung des Homoserinamids wurde das rohe hSerlacton-Lacton-Analoge, die Verbindung 4, eingeengt und mit 25 ml gesättigtem NH_3 in Methanol behandelt. Die Lösung wurde 2 Stunden bei 0°C und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Umsetzung wurde durch HPLC überwacht (Vydac® C-18, 300 A, 4,6 × 250 mm, Strömungsgeschwindigkeit 1,2 ml/min, Gradient 20-45% Acetonitril in 0,1.% TFA). Die Umsetzung war innerhalb von 18 Stunden vollständig. Die Lösung wurde eingeengt und durch präparative RP-HPLC gereinigt (Vydac® C-18, Gradient 25-45% Acetonitril in 0,1% TFA). Die Homoserinamid-Peptidfraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Man erhielt 30 mg der Verbindung 3 in Form eines weißen Feststoffes mit einer Reinheit von >98%.

Verbindung 3:

AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLEKLHTX-NH$_2$ (X=hSer, SEQ ID NO: 8)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr hSer NH$_2$ (SEQ ID NO: 8)

[0160] physikalische Daten: F. 138–142°C $[\alpha]_D^{25}$ –45,97° (c 0,25, H_2O)
FAB ($C_{176}H_{302}N_{56}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4033,9
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 6,1 (6); Ser, 1,6 (2); His, 2,8 (3); Gly, 0,97 (1); hSer, 0,97 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 2,9 (3); Val, 1,0 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 7,6 (8); Lys, 3,9 (4).
[0161] Gleichermaßen wurden die Verbindungen 22, 23 und 28 nach diesem Verfahren hergestellt.

Verbindung 22:

AVSEIQFLHN LGKHLSSLRR RELLEKLLEK LHNX-NH$_2$ (SEQ ID NO: 36)

(X = Homoserin)

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Leu His Asn Leu Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Asn hSer NH$_2$ (SEQ ID NO: 36)

[0162] physikalische Daten: F. 69,4–128°C $[\alpha]_D^{25}$ –43,93° (c 0,15, H_2O)
FAB ($C_{179}H_{302}N_{56}O_{49}$): $[M + H]^+$ 4022,9
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 4,9 (5); Ser, 2,6 (3); His, 2,8 (3); Gly, 1,0 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 3,0 (3); Val, 1,0 (1); Phe, 1,0 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,8 (9); Lys, 3,4 (3).

Verbindung 23:

AVSEIQFLHN KGKHLSSLRR RELLEKLLEK LHNX-NH_2 (SEQ ID NO: 37)

(X = Homoserin)

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Leu His Asn Lys Gly Lys His Leu
1 5 10 15
Ser Ser Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Asn hSer NH_2 (SEQ ID NO: 37)

[0163] physikalische Daten: F. 87,1–142,1°C $[\alpha]_D^{25}$ –52,14° (c 0,41, H_2O)
FAB ($C_{179}H_{303}N_{57}O_{49}$): $[M + H]^+$ 4038.
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 4,9 (5); Ser, 2,7 (3); His, 2,8 (3); Gly, 1,0 (1); hSer, 1,0 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 3,0 (3); Val, 1,1 (1); Phe, 0,9 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 7,9 (8); Lys, 3,7 (4).

Verbindung 28:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLERLLER LHTAGRRX-NH_2 (SEQ ID NO: 42) (X = Homoserin)

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 Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg
20 25 30
Leu His Thr Ala Gly Arg Arg hSer NH_2 (SEQ ID NO: 42)
35

[0164] physikalische Daten: F. 80°C $[\alpha]_D^{25}$ –48,64° (c 0,09, H_2O)
FAB ($C_{193}H_{334}N_{70}O_{56}$): $[M + H]^+$ 4530,0
AAA: Asx, 2,2 (2); Glx, 6,1 (6); Ser, 1,7 (2); His, 3,0 (3); Gly, 1,9 (2); hSer, 1,0 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,1 (2); Arg, 7,2 (7); Val, 0,8 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,4 (8); Lys, 2,1 (2).
[0165] Die Homoserin-alkylamide wurden in ähnlicher Weise aus dem Homoserin-lacton durch Lösen in DMF mit einem Gehalt an einem Überschuss des entsprechenden Alkylamins hergestellt. Nach mehrtägigem Rühren bei Raumtemperatur (die Reaktion wurde durch analytische HPLC überwacht) wurde das Gemisch zur Trockene eingedampft. Das Peptid wurde durch präparative HPLC gereinigt. Repräsentative Homoserin-alkylamide sind die Verbindungen 55 und 56.

Verbindung 55:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTX-$NHCH_2CH_3$ (SEQ ID NO: 69) (X = Homoserin)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr hSer $NHCH_2CH_3$ (SEQ ID NO: 69)

[0166] physikalische Daten: F. nicht bestimmt $[\alpha]_D^{25}$ nicht bestimmt
FAB ($C_{178}H_{306}N_{56}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4063,0
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 5,8 (6); Ser, 1,7 (2); His, 3,1 (3); Gly, 0,9 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 0,9 (1); Arg, 3,0 (3); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,4 (8); Lys, 3,7 (4); hSer, 0,9 (1).

Verbindung 56:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTX-NHCH$_2$CH$_2$C$_6$H$_5$ (SEQ ID NO: 70) (X = Homoserin)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr hSer NHCH$_2$CH$_2$C$_6$H$_5$ (SEQ ID NO: 70)

[0167] physikalische Daten: F. nicht bestimmt $[\alpha]_D^{25}$ nicht bestimmt
FAB ($C_{184}H_{310}N_{56}O_{52}$): $[M + H]^+$ 4138,8
AAA: Asx, 2,0 (2); Glx, 5,9 (6); Ser, 1,7 (2); His, 2,9 (3); Gly, 0,9 (1);.Thr, 1,0 (1); Ala, 0,9 (1); Arg, 3,0 (3); Val, 1,0 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,0 (8); Lys, 4,1 (4); hSer, 0,9 (1).

Beispiel IV

[0168] Das Cäsiumsalz von N^{α}-Boc-Nγ-Fmoc-L-2,4-diaminobuttersäure wurde an Merrifield-Harz angeheftet (DMF, 50°C, 48 Stunden) und sodann anstelle des Boc-Ala-Harzes wie in Beispiel 1 in einer Festphasensynthese verwendet. Nach Beendigung der Synthese wurde das Peptid 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 20 % Piperidin in DMF behandelt, um die Seitenketten-Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen. Das geschützte Peptid cyclisierte spontan zum Lactam, wobei es sich selbst vom Harz spaltete. Die Lösung wurde vom Harz abfiltriert und unter Vakuum eingedampft. Es blieb ein Öl zurück. Der Rückstand wurde mit flüssigem HF wie in Beispiel I behandelt. Man erhielt das rohe, ungeschützte Peptid: Das Peptid wurde wie in Beispiel I behandelt und gereinigt.

Verbindung 49:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTX (SEQ ID NO: 63)
(S = L-2,4-Diaminobutyryllactam)
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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr L-2,4-Diaminobutyryllactam (SEQ ID NO: 63)

[0169] physikalische Daten: F. 161–181°C $[\alpha]_D^{25}$ –48,38° (c 0,25, H_2O)
FAB ($C_{176}H_{300}N_{56}O_{51}$): $[M + H]^+$ 4016,8
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 6,3 (6); Ser, 1,7 (2); His, 3,3 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 2,1 (2); Arg, 2,9 (3); Val, 0,9 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,0 (8); Lys, 3,8 (4).

Beispiel V

[0170] Eine wässrige Lösung des Homoserin-lacton-Analogen von Beispiel II wurde mit Schweineleber-Esterase (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) behandelt. Die Hydrolyse des Lactons zum C-terminalen Homoserin wurde durch analytische HPLC überwacht. Nachdem die Hydrolyse als beendet beurteilt wurde, wurde das Material durch präparative HPLC wie in Beispiel 1 gereinigt.

Verbindung 37:

AVSEHQLLHD KGKSIQDLRR RELLEKLLEK LHTX-OH (SEQ ID NO: 51)

(X = Homoserin)

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 Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys
20 25 30
Leu His Thr hSer OH (SEQ ID NO: 51)

[0171] physikalische Daten: F. nicht bestimmt $[\alpha]_D^{25}$ nicht bestimmt
FAB ($C_{176}H_{301}N_{55}O_{53}$): $[M + H]^+$ 4035,1
AAA: Asx, 2,1 (2); Glx, 5,9 (6); Ser, 2,0 (2); His, 3,1 (3); Gly, 0,8 (1); hSer, 0,8 (1); Thr, 1,0 (1); Ala, 1,0 (1); Arg, 3,0 (3); Val, 1,3 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,1 (8); Lys, 3,8 (4).

Beispiel VI

[0172] Gemäß Beispiel 1 wurde das geschützte Peptid-Harz

BocAVS(Bzl)E(OBz)H(Bom)QLLHD(OBzl)R(Ts)GR(Ts)S(Bzl)IQD(OBz)-
LR(Ts)R(Ts)E(OBz)LLE(OBzl)R(Ts)LLK(Fmoc)R(Ts)LH(Bom)T(Bzl)A-O-PAM in

einer Menge von 0,35 mmol synthetisiert. Sämtliche N^{α}-Gruppen wurden mit tert.-Butoxycarbonyl (Boc) geschützt. Bei den Seitenkettenschutzgruppen handelte es sich um die angegebenen Gruppen. Nach Beendigung der Synthese wurde das Peptid-Harz 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 ml 20% Piperidin in Dimethylformamid (DMF) behandelt, um die Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe am Lysin zu entfernen. Das Harz wurde nacheinander mit DMF, MeOH und CH_2Cl_2 gewaschen und getrocknet. Man erhielt 1,6 g partiell geschütztes Peptid. 0,8 g (0,175 mmol) des partiell geschützten Peptids wurden an Lysin mit 0,44 g (0,3 mmol) Methoxydi-(ethylenoxy)-essigsäure [PEG(2)CH_2COOH] in Gegenwart von 0,16 g (0,3 mmol) Benzotriazolyloxy-tris-(pyrrolidino)-phosphoniumhexafluorphosphat (PyBop) und 0,067 g (0,525 mmol) Diisopropylethylamin (DIEA) 5 Stunden bei Raumtemperatur in 20 ml DMF acyliert. Nach 5 Stunden wurde das Harz filtriert und nacheinander mit DMF, MeOH und CH_2Cl_2 gewaschen. Die Acylierungsstufe wurde zweimal wiederholt, bis ein negatives Ninhydrin-Ergebnis am Harz erzielt wurde. Das endgültige Peptid wurde vom Harz unter Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen und Reinigung gemäß Beispiel I abgespalten. Man erhielt 100 mg der Verbindung 19.

Verbindung 19:

AVSEHQLLHDRGRSIQDLRRRELLERLLKRLHTA-OH (SEQ ID NO: 18)

$CH_3O(CH_2CH_2O)_2CH_2C{=}O$
Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Arg Gly Arg Ser Ile
1 5 10 15
Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu
20 25
Lys($COCH_2$PEG2) Arg Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 18)
30

[0173] physikalische Daten: F. 145–195°C $[\alpha]_D^{25}$ –44,60° (c 0,2, H_2O)
FAB ($C_{183}H_{316}N_{64}O_{54}$): $[M + H]^+$ 4276,2
AAA: Asp, 2,1 (2); Glu, 5,0 (5); Ser, 1,6 (2); His, 2,9 (3); Gly, 0,9 (1); Thr, 1,9 (2); Arg, 7,1 (7); Val, 1,1 (1); Ile, 1,0 (1); Leu, 8,0 (8); Lys, 0,9 (1).

Beispiel VII

[0174] Ein Peptid wurde auf die gleiche Weise wie in Beispiel IV synthetisiert, abgespalten und gereinigt, mit der Ausnahme, dass als Acylierungsmittel 2-Methoxypoly-(ethylenoxy)-essigsäure [PEG(5000)CH_2CO_2H] verwendet wurde. 0,8 g (0,175 mmol) des partiell geschützten Peptids ergaben 300 mg reine Verbindung 20.

Verbindung 20:

AVSEHQLLHDRGRSIQDLRRRELLERLLKRLHTA-OH (SEQ ID NO: 19)

$CH_3O(CH_2CH_2O)_{110}CH_2C{=}O$

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

1 5 10 15

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu

20 25

Lys($COCH_2$PEG5000) Arg Leu His Thr Ala OH (SEQ ID NO: 19)

30

[0175] physikalische Daten: F. 105°C $[\alpha]_D^{25}$ –22,95° (c 0,11, 50% wässrige HOAc)
AAA: Asp, 2,0 (2); Glu, 4,8 (5); Ser, 1,6 (2); His, 2,6 (3); Gly, 1,1 (1); Thr, 1,1 (1); Arg, 7,3 (7); Val, 0,8 (1); Ile, 0,9 (1); Leu, 8,3 (8); Lys, 1,1 (1); Ala, 1,8 (2).

Beispiel VIII

Synthese von hPTHrp(1-34)-analogem Gen

[0176] Ein synthetisches Gen, das für das hPTHrp(1-34)-Analoge, Verbindung 4 (SEQ ID NO: 9), kodiert, wurde so konstruiert, dass es die Nucleotidsequenz und die Enzymrestriktionsstellen gemäß der Darstellung in **Fig.** 1 aufwies. Die erforderlichen Oligodesoxynucleotide wurden mit einem DNA-Synthesegerät (Milligen/Biosearch) unter Anwendung des Phosphoramidit-Verfahrens von Sinha et al., Nucleic Acid Research, Bd. 12 (1984), S. 4539-4557, hergestellt. Nach Schutzgruppenentfernung wurden die rohen Oligonucleotide durch Gelelektrophorese an präparativen 15%-Polyacrylamidgelen gereinigt. Die Oligonucleotide wurden mit UV-Licht lokalisiert, aus dem Gel ausgeschnitten, über Waters c18 Sep-pak®-Patronen entsalzt und lyophilisiert.
[0177] Eine Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde an einem Perkin-Elmer-Cetus-Thermocycler mit 25 Zyklen durchgeführt: 94°C für 1 Minute, 50°C für 2 Minuten und 72°C für 3 Minuten, wobei Reagenzien, einschließlich Taq-Polymerase, aus dem "GeneAmp"-DNA-Amplifikationskit (Perkin-Elmer-Cetus) verwendet wurde.
[0178] Zwei überlappende Oligonucleotide, ein 88-mer (2 µg), PTH3, (SEQ ID NO: 31):

```
CCTCTAGATC TCCGCGGCGC TAGC ATG GCT GTT TCT GAA CAT CAG 45
                           Met Ala Val Ser Glu His Gln
                                    1               5
CTG CTT CAT GAC AAA GGT AAA TCG ATT CAA GAT CTG AGA CGT C 88
Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg
            10                  15                  20
und ein anti-sense 90-mer (2 µg), PTH 4 (SEQ ID NO:32):
CCTCGAAGCT TATGCATCAT TATCTAGA CAT AGT ATG CAG CTT TTC 46
                              Met Thr His Leu Lys Glu
                                               30
AAG CAG TTT CTC CAG CAG CTC GCG ACG TCT CAG ATC TTG AAT 88
Leu Leu Lys Glu Leu Leu Glu Arg Arg Arg Leu Asp Gln Ile
            25                  20                  15
CG 90,
```

wurden als Matrizen-DNA-Sequenzen für das hPTHrp(1-34)-analoge Gen hergestellt. Unter Verwendung der zwei flankierenden Primer, PTHPCR1: CCTCTAGATC TCCGCGGCGC TAG (SEQ ID NO: 33) und PTHPCR2: CCTCGAAGCT TATGCATCAT TATC (SEQ ID NO: 34), wurde das gesamte Gen durch PCR amplifiziert. Die amplifizierten DNA-Produkte wurden durch Gelelektrophorese an 4% NuSieve®-Agarose-Gel gereinigt. Die das synthetische hPTHrp (1-34)-analoge Gen mit einer Länge von etwa 150 Basen enthaltende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Etwa 200 ng DNA wurden durch Elu-Quik®-Glasgel-DNA-Extraktion (Schleicher & Schuell, Keene, NH) isoliert.

Beispiel IX

Molekulare Klonierung eines Gens eines hPTHrp(1-34)1-Analogen

[0179] Zum Subklonieren des Gens des hPTHrp(1-34)-Analogen von Beispiel VI wurden 200 ng der amplifizierten DNA isoliert und durch die Restriktionsenzyme HindIII und SacII geschnitten. Wie in **Fig.** 2 dargestellt, wurde die DNA mit 2 µg TrpLE-18-Prot (Ile^3, Pro^5)-Plasmid, das vorher mit HindIII und SacII gespalten worden war, ligiert.

[0180] Das erhaltene Plasmid TrpLE-18-hPTHrp(1-34)1, das eine Kopie des Gens des hPTHrp (1-34)-Analogen enthielt, wurde sodann in kompetente E. coli HB 101-Zellen (CLONTECN, Palo Alto, CA) transformiert. Transformanten wurden zur Bestätigung der Insertion einer PRT-Analyse unterworfen. Transformierte Zellkolonien wurden ausgewählt und 5 Minuten einer Siedebehandlung in 200 µl Wasser unterworfen. 2 µl wurden der PCR mit zwei das Insert flankierenden Primern unterworfen. Das PCR-Produkt wurde sodann an 1% Agarosegel analysiert, um das Vorliegen von 1 Kopie des hPTHrp (1-34)-Geninserts zu bestätigen. Das TrpLE-18-hPTHrp(1-34)1-Konstrukt wurde sodann durch DNA-Sequenzierung an einem automatischen DNA-Sequenziergerät (Applied Biosystems Modell 373A, Foster City, CA) unter Verwendung des Dye Deoxy Terminators Sequencing-Kits des Vertreibers bestätigt.

Beispiel X

Konstruktion eines Trp-LE-18-Vektors mit einem Gehalt an Mehrfachkopien des Gens des hPTHrp(1-34)-Analogen

[0181] In der Nähe des Beginns und des Endes der Gensequenz des hPTHrp(1-34)-Analogen wurden einzige Nhel- und Xbal-Restriktionsstellen angebracht. Diese beiden Stellen, die unterschiedliche Sequenzen erkennen, jedoch identische einzelsträngige kohäsive Termini bilden, ermöglichen die Konstruktion von Mehrfachkopien-hPTHrp(1-34)-Genen innerhalb des Trp-LE-18-Vektors.

[0182] Die Strategie zur Konstruktion von wiederholten hPTHrp(1-34)-Sequenzen in Tandemstellung ist in **Fig.** 3 dargestellt. In getrennten Reaktionen wurden 5 µg Plasmid-Trp-Le-18-hPTNrp(1-34)1 mit einem Gehalt an einer einzelnen Kopie des Gens mit BamHI+Nhel und Xbal+BamHI gespalten. Von jedem Verdauungsprodukt wurden etwa 300 ng des Fragments mit einem Gehalt an dem Gen des hPTHrp(1-34)-Analogen isoliert.

Diese beiden Fragmente wurden vermischt und unter Bildung des Trp-LE-18-hPTNrp(1-34)-2-Plasmids ligiert. Dieses Plasmid wurde zur Transformation von kompetenten E. cokli HB 101-Zellen verwendet. Eine Größenbestimmung der transformierten PCR-Produkte an 1% Agarosegel wurde zur Bestimmung des Vorliegens von 2 Kopien des hPTHrp(1-34)-Geninserts verwendet. Trp-LE-18-hPTHrp(1-34)2 mit einem Gehalt an 2 Kopien des Gens wurde sodann durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Die korrekte Fusion der beiden hPTHrp(1-34)-Gene führt zur Entfernung der Nhel- und Xbal-Stellen an der Verbindungsstelle: Dies ermöglicht es, dass die verbleibenden Xbal- und Nhel-Stellen, die die Tandemgene flankieren, jeweils als einzelne Stellen vorliegen.

[0183] Durch Wiederholung dieses Vorgangs wurde das endgültige Plasmid Trp-LE-18-hPTHrp(1-34)4 mit einem Gehalt an 4 Kopien des hPTHrp(1-34)-Gens gemäß der Darstellung in **Fig.** 4 konstruiert. Durch DNA-Sequenzanalyse wurde bestätigt, dass die Sequenz von Trp-LE-18-hPTHrp(1-34)4 korrekt war.

Beispiel XI

Expression und Reinigung von Trp-LE-18 hPTHrp(1-34)4 Induktion von Trp-LE-18-hPTHrp(1-34)4

[0184] Eine Starterkultur von 50 ml LB-Kulturmedium (J. N. Miller, "Experiments in Molecular Genetics", (1972), S. 431; diese Literaturstelle wird durch Verweis zum Gegenstand der Beschreibung gemacht) mit einem Gehalt an 50 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Tryptophan wurde mit E. coli-Zellen mit einem Gehalt an Trp-Le-18-hPTHrp(1-34)4-Plasmid inokuliert und über Nacht bei 37°C etwa 6 Stunden unter heftigem Schütteln bis zu einem A_{550}-Wert von etwa 6 gezüchtet. Zwei Liter LB-Kulturmedium für die Produktion wurden auf 37°C vorgewärmt und mit 20 ml Starterkultur angeimpft. Es ergab sich ein A_{550}-Wert von etwa 0,06. Die Kultur wurde sodann unter heftigem Schütteln bis zu einem A_{550}-Wert von 0,6 bis 0,8 gezüchtet, wonach 2 ml einer Lösung von 10 mg/ml Indolacrylsäure (IAA) zugegeben wurden. Das Wachstum wurde unter guter Belüftung etwa 16 Stunden bis zu einem endgültigen A_{550}-Wert von etwa 6 (typischerweise zwischen 4 und 10) fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation eingeengt und in 500 ml 50 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 0,1 mM EDTA-Pufferlösung (Tris-Puffer) resuspendiert.

[0185] Die Suspension wurde unter Verwendung des Ultraschallgeräts Modell 220 F der Firma Heat Systems-Ultrasonics, Inc. (ausgerüstet mit einem ¾"-Horn), das zur Vermeidung einer Überhitzung mit 50% seiner vollen Kapazität betrieben wurde, einer Ultraschallbehandlung unterzogen.

[0186] Um das Ausmaß der Induktion zu bestimmen, wurden die vollständigen Zellen durch SDS-PAGE analysiert. Die vom Trp-LE-18-hPTHrp(1-34)4-Konstrukt abgeleiteten Genprodukte waren als Hauptbande mit dem vorhergesagten Molekulargewicht von etwa 17 000 erkennbar. Dies macht 10% des gesamten zellulären Proteins aus.

Isolierung des Fusionsproteins

[0187] Das Zelllysat wurde 15 Minuten mit etwa 3600 × g zentrifugiert, um das Trp-LE-18-hPTHrp(1-34)4-Fusionsprotein zu pelletisieren. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 200 ml Tris-Puffer resuspendiert (typischerweise 40-80 A_{550}/ml).

Beispiel XII

Prozessierung des Fusionsproteins und Reinigung von homo-Ser-Lacton- hPTHrp(1-34)-Peptid

[0188] Die Abspaltung der Methioninreste, die das multimere Fusionsprotein von hPTHrp(1-34) flankieren, mit CNBr, setzt das angestrebte homo-Ser-Lacton-hPTHrp(1-34)-Polypeptid frei, das auf die nachstehend angegebene Weise gereinigt wurde.

CNBr-Behandlung des Fusionsproteins

[0189] Das gewaschene Pellet des Trp-LE-18hPTHrp(1-34)4-Fusionsproteins wurde durch mäßiges Rühren in 60 ml 70%-iger Ameisensäure resuspendiert (etwa 20 mg/ml Gesamtprotein; typischerweise Material von 1000 A_{550}-Einheiten von Zellen wird in 3 ml gelöst). Wenige Tropfen Octanol werden zugegeben. N_2 wird vor Zugabe von 5,5 g CNBr 20 Minuten durch die Lösung geleitet. Diese Umsetzung wurde 6 Stunden bei 25°C durchgeführt, bevor ein gleiches Volumen von (MeOH : H_2O 50 : 50). mit der Probe vermischt und anschließend durch Rotationsverdampfen entfernt wurde. Nach 2-4-maliger Wiederholung dieses Vorgangs waren der Großteil der Ameisensäure und das CNBr im wesentlichen entfernt. Die Probe wurde sodann zur Trockene eingedampft, erneut in 200 ml Wasser gelöst und zur Aufbewahrung lyophilisiert.

Reinigung von homo-Ser-Lacton-hPTHrp(1-34)

[0190] Der Überstand der CNBr-Spaltung wurde gegen 50 mM KH_2PO_4 vom pH-Wert 6,5 24 Stunden unter mehrfachem Austausch der Flüssigkeit dialysiert. Während der Dialyse wurde der pH-Wert auf 6,5 gehalten. Nach der Dialyse wurde der Niederschlag durch Hochgeschwindigkeitszentrifugation entfernt. Der Überstand wurde durch eine Gelman-0,45 µm-Filtervorrichtung (Acrodisc 4184) geklärt.

Kationenaustauschchromatographie

[0191] Eine anfängliche Reinigung wurde durch Kationenaustauschchromatographie an einer Bio-Gel-TSK-SP-5PW-HPLC-Säule (21,5 × 150 mm) erreicht. Es wurden die folgenden chromatographischen Bedingungen zur Erzielung einer Fließgeschwindigkeit von 8 ml/min und einer Ausbeute von etwa 12 mg hochgereinigtem homo-Ser-Lacton-hPTHrp(1-34)-Peptid eingehalten:

1. Säulenäquilibration 50 mM KH_2PO_4, pH-Wert 6,5
2. Aufsetzen von 10 ml geklärtem Überstand (etwa 1,5 Liter Kulturbrühe oder 2,4 g Einschluß).
3. Waschen der Säule mit 50 mM KH_2PO_4, pH-Wert 6,5, mit einem Gehalt an 50 mM NaCl bis zur Stabilisierung der Basislinie.
4. Elution der Säule mit 50 mM KH_2PO_4 vom pH-Wert 6,5 mit einem Gehalt an 90 mM NaCl. Sammeln der Fraktionen während der etwa 45 Minuten.
5. Analysieren der 90 mM-NaCl-Fraktionen auf den Gehalt an homo-Ser-Lacton-hPTHrp(1-34) durch C18-HPLC vor der Vereinigung und Lagerung.

Umkehrphasen-HPLC-Chromatographie

[0192] Eine Umkehrphasensäule Poros R/H 4,6 × 100 mm (Perseptive Biosystems, Cambridge, MA) wurde für die endgültige Reinigungsstufe verwendet. Es wurden die folgenden chromatographischen Bedingungen eingehalten:
Mobile Phase A: 0,1% Trifluoressigsäure (TFA)/Wasser
B: 0,1% Trifluoressigsäure (TFA)/CH_3CN

Zeit	Fließgeschwindigkeit	% B
0 min	4 ml/min	15
5,0 min	4 ml/min	40
5,2 min	4 ml/min	100
6,8 min	4 ml/min	100
7,0 min	4 ml/min	15

[0193] Die Retentionszeit des homo-Ser-Lacton-hPTHrp(1-34), Verbindung 4, betrug etwa 2,943 Minuten. Das gereinigte Peptid wies bei Bestimmung durch Massenspektroskopie eine Reinheit von etwa 98% auf.

Beispiel XIII

[0194] Die erfindungsgemäßen Verbindungen wurden bezüglich ihres Einflusses auf die Knochenmasse in ovariektomierten Ratten im allgemeinen gemäß den Verfahren von Gunness-Hey und Hock, Metab. Bone Dis., Bd. 5 (1984), S. 177-181, bewertet.
[0195] Ausgewachsene, weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden akklimatisiert, nach dem Gewicht in Gruppen eingeteilt (n = 9, 10 oder 12) und einer bilateralen Ovariektomie (OVX) oder einer Scheinoperation unterworfen. Die Dosierung wurde 17 Tage nach dem chirurgischen Eingriff begonnen und 20 Tage fortgesetzt. Die Testverbindung wurde subkutan einmal täglich in 2% Rattenserum/Kochsalzlösung als Träger verabreicht.
[0196] 20 Tage nach der Dosierung wurden die Ratten getötet. Die rechten Oberschenkel wurden herausgeschnitten. Die Oberschenkel wurden halbiert. Die distale Hälfte der Oberschenkel (DHF) wurde ferner durch Ausbohren der Trabeculae in trabekulären Knochen (TB) und kortikalen Knochen (CB) getrennt. Calcium wurde extrahiert und mit dem Calcette-Calcium-Analysator gemessen und als durchschnittliches Knochen-Ca in mg/DHF/100 g Körpergewicht angegeben.
[0197] Der Doppelproben-t-Test wurde zum Vergleich der OVX- und Scheingruppen verwendet. Zum Vergleich der OVX-Gruppen wurde Einweg-ANOVA herangezogen, gefolgt von einem Fisher-LSD-Mehrfachvergleich zum Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen mit dem Träger.

[0198] Die Ovariektomie verursachte einen erheblichen Verlust der gesamten Knochenmasse, vorwiegend aus dem trabekulären Knochen. Das gesamte Knochencalcium war 47 bis 54% niedriger als bei den scheinoperierten Kontrollen.

[0199] bPTH(1-34) und hPTHrp(1-34) ergaben bei 80 µg/kg/Tag eine statistisch signifikante Zunahme des gesamten Knochencalciums bei behandelten OVX-Ratten im Bereich von 53 bis 95% bzw. 18 bis 40%. Beim kortikalen Knochencalcium gab es jedoch keine signifikante Zunahme.

[0200] Die erfindungsgemäßen Verbindungen führten in Dosen von 80 µg/kg/Tag zu einer Erhöhung des gesamten Knochencalciums um 66 bis 138% und des trabekulären Calciums um 87 bis 128%. Ferner waren gegenüber unbehandelten OVX-Kontrollen das kortikale Knochencalcium, die trabekuläre Dicke und das Knochenvolumen signifikant erhöht.

[0201] In diesem Test wurden die folgenden Verbindungen getestet:

Verbindung Nr.	n (Anzahl der Tests)	Trabekuläres Knochencalcium (% Zunahme gegenüber OVX)	gesamtes Knochencalcium (% Zunahme gegenüber OVX)
1 (SEQ ID NO:7)	6	101-128 %	88-138 %
2 (SEQ ID NO:6)	3	87-102 %	66-114 %
4 (SEQ ID NO:9)	3	-	88-114 %

[0202] In ähnlichen Untersuchungen erhielten ovariectomierte Ratten 5, 10 und 20 Tage lang Dosen von 40 µg/kg/Tag. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Verbindung Nr.	n (Anzahl der Tests)	Anzahl der Tage (d) der Dosierung	gesamtes Knochencalcium (% Zunahme gegenüber OVX)
1 (SEQ ID NO:7)	3	20 d	73-109 %
4 (SEQ ID NO:9)	5	20 d	79-105 %
4 (SEQ ID NO:9)	1	10 d	79 %
49 (SEQ ID NO:63)	1	10 d	93 %
4 (SEQ ID NO:9)	1	5 d	55 %
42 (SEQ ID NO:56)	1	5 d	60 %

Beispiel XIV

[0203] Ausgewachsene weibliche New Zealand White-Kaninchen (Hazelton Research Products, Inc., 3,6 kg, n=9-11/Behandlungsgruppe) erhielten täglich 13 Monate lang eine Injektion von Träger oder 0,15 mg/kg Prednison. Die Knochen-Mineraldichte (BMD) wurde durch Doppelenergie-Röntgenabsorptionsmessung (Hologic Model QDR-1500 W, Hologic, Inc., Waltham, MA) gemessen. Biochemische Marken des Knochenmetabolismus wurden verfolgt. Nach 9 Monaten erhielten Untergruppen zusätzlich 0,05, 0,15 oder 0,5 µg/kg/Tag der Verbindung 1 (SEQ ID NO: 7) auf subkutanem Wege. Zwei Monate später wurden die Dosen auf 0,5, 3 und 10 µg/kg/Tag angehoben. Die Behandlung mit Prednison führte zu einem raschen anfänglichen Verlust (2-4 Monate), wonach sich für den Rest der Untersuchung ein stabiler BMD-Wert anschloß. Die endgültigen BMD-Verluste gegenüber der Basislinie von 12,4 ± 1,3%, 18,1 ± 1,9% und 11,8 ± 2,5% wurden in der Lendenwirbelsäule-A/P-Ansicht, der lateralen Ansicht und im distalen Oberschenkel festgestellt. Eine geringere Abnahme (7,8 ± 2,2%) wurde in der femoralen Diaphyse festgestellt. Die geringeren, früheren Dosen führten zu keiner Veränderung dieser Zahlen. Nach 30-60 Tagen der Verabreichung von 10 µg/kg der Verbindung 1 an Tiere, die weiter Prednison erhielten, ergab sich eine Wiederherstellung des BMD-Wertes an sämtlichen Stellen auf Werte, die sich nicht signifikant von den Werten von Kontrollkaninchen unterschieden, die 12 Monate lang mit dem Träger allein behandelt worden waren. Osteocalcin im Serum fiel bei mit Prednison behandelten Tieren 6,4-fach von einer Basislinie von 50 ± 8 ng/ml ab, kehrte aber durch gleichzeitige Verabreichung von 10 µg/kg

der Verbindung 1 auf Normalwerte zurück.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: Syntex (U.S.A.) Inc.

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Method for the Treatment of Corticosteroid Induced Osteopenia

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 86

(iv) KORRESPONDENZANSCHRIFT:

(A) ADRESSAT: Heller Ehrman White & McAuliffe

(B) STRASSE: 525 University Ave.

(C) ORT: Palo Alto

(D) STAAT: CA

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 94301

(v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy Disk

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER:

(B) ANMELDETAG:

(C) AKTENZEICHEN:

(viii) ANGABEN ZUM VERTRETER:

(A) NAME: Chow, Y. Ping

(B) VERTRETERNUMMER: 30,740

(C) AKTENZEICHEN: 27610-04

(ix) TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: 415-324-7078

(B) TELEFAX: 415-324-0638

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Phe

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID Nr.: 3:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Arg Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 34

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa34 = Homoserin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Xaa

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 34

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa34 = Homoserinlacton"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Xaa

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 37 Aminosäuren

(B) TOPOLOGIE: linear

(D) ART: Aminosäure

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala Gly Arg Arg
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Glu Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

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

Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

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

Asp Leu Arg Arg Ala Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

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

Asp Leu Ala Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Ala Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Lys Arg Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 29

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa29 = Lysin-($OCCH_2(OCH_2CH_2)_2OCH_3$)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Xaa Arg Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 29

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa29 = Lysin-($OCCH_2(OCH_2CH_2)_{110}OCH_3$)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Xaa Arg Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Ser Leu Leu Ser Ser Leu Leu Ser Ser Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 8

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa8 = Norleucin"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 18

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa18 = Norleucin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Ser
1 5 10 15

Ser Xaa Glu Arg Val Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Asn Tyr

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 8

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa8 = Norleucin"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 18

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa18 = Norleucin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Ser
1 5 10 15

Ser Xaa Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Asn Tyr

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 35 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Met Ala
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: spiralförmig

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 8

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa8 = Glutaminsäure oder Arginin"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Region

(B) LAGE: 1..10

(C) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Sequenz 26 ist in den Positionen 22 bis 31 der Sequenzen 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 und 14 eingebettet".

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Xaa Lys Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: spiralförmig

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 8

(C) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa8 = Glutaminsäure, Lysin oder Lysin-(OCCH2PEGX)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Region

(B) LAGE: 1..10

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Sequenz 27 ist in den Positionen 22 bis 31 der Sequenzen 15, 16, 17, 18 und 19 eingebettet".

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Xaa Arg Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: spiralförmig

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid

(B) LAGE: 1..10

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Sequenz 28 ist in denPositionen 22 bis 31 von Sequenz 20 eingebettet".

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: spiralförmig

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid

(B) LAGE: 1..10

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Sequenz 29 ist in den Positionen 22 bis 31 von Sequenz 21 eingebettet".

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

Ser Leu Leu Ser Ser Leu Leu Ser Ser Leu

1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: spiralförmig

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Peptid

(B) LAGE: 1..10

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Sequenz 30 ist in den Positionen 22 bis 31 von Sequenz 22 eingebettet".

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

Ala Phe Tyr Asp Lys Val Ala Glu Sys Leu

1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 88 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

CCTCTAGATC TCCGCGGCGC TAGCATGGCT GTTTCTGAAC ATCAGCTGCT TCATGACAAA GGTAAATCGA TTCAAGATCT GAGACGTC 88

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 90 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

CCTCGAAGCT TATGCATCAT TATCTAGACA TAGTATGCAG CTTTTCAAGC AGTTTCTCCA GCAGCTCGCG ACGTCTCAGA TCTTGAATCG 90

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: nein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

CCTCTAGATC TCCGCGCGCT AGC 23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(iv) ANTI-SENSE: ja

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

CCTCGAAGCT TATGCATCAT TATC 24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Leu His Asn Leu Gly Lys His Leu Ser

1 5 10 15

Ser Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Asn Tyr

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 34

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa ist Homoserin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Leu His Asn Leu Gly Lys His Leu Ser

1 5 10 15

Ser Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Asn Xaa

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 34

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa ist Homoserin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

Ala Val Ser Glu Ile Gln Phe Leu His Asn Lys Gly Lys His Leu Ser

1 5 10 15

Ser Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Asn Xaa

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

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

1 5 10 15

Asp Leu Lys Leu Lys Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 35 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His
20 25 30

Thr Ala Pro
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 37 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His
20 25 30

Thr Ala Gly Arg Arg
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 38 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 38

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa ist Homoserin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His
20 25 30

Thr Ala Gly Arg Arg Xaa

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Tyr

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 13

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa ist Cys(CH-2CONH(CH-2)-2NH(biotinyl)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 13

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa ist Lys(7-dimethylamino-2-oxo-2H-1-benzopyran-4-acetyl)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Xaa Ser Ile Gln
1 5 10 15
Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30
Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 35 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

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

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 33 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 4

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa4 ist Glu(OCH-3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 10

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa10 ist Asp(OCH-3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 17

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa17 ist Asp(OCH3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 22

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa22 ist Glu(OCH-3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 25

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa25 ist Glu(OCH-3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 29

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa29 ist Glu(OCH-3)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

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

Xaa Leu Arg Arg Arg Xaa Leu Leu Xaa Lys Leu Leu Xaa Lys Leu His
20 25 30

Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 33 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 4

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa4 ist Glu(OCH-3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 10

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa10 ist Asp(OCH-3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 17

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa17 ist Asp(OCH3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 22

(D) SONSTIGE ANGABEN: /Anmerkung = "Xaa22 ist Glu(OCH-3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 25

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa25 ist Glu(OCH-3)"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 29

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa29 ist Glu(OCH-3)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

Ala Val Ser Xaa His Gln Leu Leu His Xaa Lys Gly Lys Ser Ile Gln

1 5 10 15

Xaa Leu Arg Arg Arg Xaa Leu Leu Xaa Lys Leu Leu Xaa Lys Leu His

20 25 30

Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 34

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa ist Homoserin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Xaa

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 35 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala Pro
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Pro

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Pro

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 55:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 33 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 55:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Pro

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 56:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 32 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 56:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu Pro
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 57:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 37 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 57:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Arg Ser Ala Trp
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 58:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 42 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 58:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala Gly Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp
35 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 59:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 42 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 59:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala Gly Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp
35 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 60:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 42 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 13

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa13 ist Lys(dihydroxycinnamoyl)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 60:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His
20 25 30

Thr Ala Gly Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp
35 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 61:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 8

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Leu8 ist Norleucin"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 18

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Leu18 ist Norleucin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 61:

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

Ser Leu Thr Arg Ser Ala Trp Leu Arg Lys Sys Leu Gln Asp Val His Asn Tyr
20 25 30

Asn Tyr

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 62:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 35 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 62:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Met Ala
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 63:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 33 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 33

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa29 ist Thr(1,4-diaminobutyryllactam)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 63:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Xaa

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 64:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 64:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 65:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 65:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu His Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 66:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 66:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 67:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 67:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Ile Ala Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 68:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 68:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Glu Ile His
20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 69:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 34

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa ist Homoserin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 69:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Xaa

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 70:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 34

(C) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa ist Homoserin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 70:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Xaa

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 71:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: beides

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 71:

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

1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His

20 25 30

Thr Ala

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 72:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 37 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 72:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Arg Ser Ala Trp
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 73:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 36 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 36

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa ist Ala-3-(2-naphthyl)-L-alanin"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 73:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Arg Ser Xaa
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 74:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 37 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 74:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Arg Ser Ala Trp
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 75:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 38 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 75:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala Glu Ile Arg Ala
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 76:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 37 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 76:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala Glu Ile Arg
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 77:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 36 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 77:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Arg Glu Ile
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 78:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 35 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 78:

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

Asp Leu Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
20 25 30

Thr Ala Glu
35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 79:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 34 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: N-Terminus

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 8

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Leu8 ist Norleucin"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 18

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Leu18 ist Norleucin"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 34

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa ist Homoserinlacton"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 79:

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

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

Asn Xaa

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 80:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 32 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 80:

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

Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala
20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 81

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 28 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 81

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

Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 82

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 27 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 82

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

Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His Thr Ala
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 83:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 41 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 83:

Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Arg Gly Arg Ser Ile Gln Asp Leu
1 5 10 15

Arg Arg Arg Glu Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His Leu His
20 25 30

Arg Gly Arg Arg Thr Arg Ser Ala Trp
35 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 84

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 35 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 84

Leu Leu His Asp Arg Gly Arg Ser Ile Gln Asp Leu Arg Arg Arg Glu
1 5 10 15

Leu Leu Glu Arg Leu Leu Glu Arg Leu His Ala Gly Arg Arg Thr Arg

20 25 30

Ser Ala Trp

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 85

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: spiralförmig

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 1 und 4

(d) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa1 und Xaa4 = Glu, Glu(OCH3), His oder Phe".

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 2

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa2 ist Leu oder Phe"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 5

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa5 ist Lys oder His"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 7 und 10

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa7 und Xaa 10 sind Leu oder Ile"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 8

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa8 ist Ala, Arg oder Glu"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 9

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa9 ist Lys oder Glu"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 85

Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 86

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: spiralförmig

(ii) MOLEKÜLTYP: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: nein

(v) FRAGMENTTYP: inneres Fragment

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 1 und 4

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa1 und Xaa4 sind Glu, Glu(OCH3), His oder Phe

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 2

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa2 ist Leu oder Phe"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Stelle

(B) LAGE: 8

(D) SONSTIGE ANGABEN: / Anmerkung = "Xaa8 ist Glu, Lys oder Lys(COCH2PEGX)"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 86

Xaa Xaa Leu Xaa Arg Leu Leu Xaa Arg Leu

1 5 10

Patentansprüche

1. Verwendung eines synthetischen Polypeptidanalogen von Parathyroidhormon (PTH), Parathyroidhormon-verwandtem Peptid (PTHrp) oder eines physiologisch aktiven, verkürzten Homologen oder Analogen von PTH oder PTHrp, oder eines Salzes davon, in welchem die Aminosäurereste (22-31) eine amphipathische α-Helix bilden, die Reste (22-31) aus hydrophilen Aminosäuren (Haa) und lipophilen Aminosäuren (Laa) ausgewählt sind, die in der Reihenfolge

$Haa(LaaLaaHaaHaa)_2Laa$

angeordnet sind, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Corticosteroid-induzierter Osteopenie.

2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Sequenz der Aminosäurereste (22-31) ausgewählt ist aus (SEQ ID NR: 85, 86, 26, 27, 28, 29 und 30).

3. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Polypeptid die SEQ ID NR. 7 hat.

4. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin die wirksame Menge des Polypeptids im Bereich von etwa 0,002 µg Polypeptid/kg Körpergewicht des Patienten/Tag bis etwa 10 µg Polypeptid/kg Kör-

pergewicht des Patienten/Tag beträgt.

5. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, worin das Arzneimittel in Dosierungseinheitsform etwa 1 µg bis etwa 1000 µg des Polypeptids und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen