

PTH-ANALÓGOK

70459

SANDOZ LTD., Bázél, Svájc

Bejelentés napja 1993.07.06.

Kivonat

A találmány PTH-szerű aktivitást mutató és legalább egy módosítást magában foglaló olyan PTH-vegyületekre vonatkozik, ahol a módosulat bizonyos megkötésekkel az alábbiak valamelyike lehet:

- a) a PTH-vegyület terminális aminocsoportjához kapcsolódó legalább egy L- vagy D- α -aminosav-csoport, C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoport vagy adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkil-, C₂₋₈ alkenil-, C₂₋₈ alkinil-csoport, aralkilcsoport, aralkenilcsoport vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoport és/vagy a PTH-vegyület egy vagy több oldalláncához kapcsolódó legalább egy C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoport vagy adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkilcsoport, C₂₋₈ alkenilcsoport, C₂₋₈ alkinilcsoport, aralkilcsoport, aralkenilcsoport vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoport vagy
- b) a természetben előforduló PTH-szekvencia 1-38. helyzetében legalább egy α -aminosav egység, amely egy természetes vagy egy nem-természetes aminosavegységgel helyettesítve van, ahol az utóbbi aminosav egység adott esetben védett formában lehet, és így az 1-es és a 2-es helyzetben levő aminosavegységek a PTH-szekvencia aminosav-

végcsoportján egy pszeudo-peptiddel lehetnek helyettesítve

vagy az ilyen módosulatok kombinációja, szabad alakban vagy só alakjában vagy komplex alakban. A találmány az ilyen PTH-vegyületek előállítási eljárására is vonatkozik.

A találmány továbbá olyan nukleotid szekvenciára is vonatkozik, amely kódol egy olyan fúziós proteint, amely N-terminális T4 bakteriofág gp55 gén polipeptidet és egy kívánt közepes méretű, annak C-terminálisához kapcsolódó polipeptidet tartalmaz. A találmány továbbá ilyen DNS-szekvenciát tartalmazó bakteriális expressziós vektorra is vonatkozik.

A találmány szerinti PTH-vegyületek a csontképződés javítását elősegítő gyógyászati hatást mutatnak.



P9500115

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

0170/95
4400/95

Képviselő:

"A"

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

PTH-ANALÓGOK

SANDOZ LTD., Bazel, Svájc

Feltalálók:

BAUER Wilfried, Lampenberg, Svájc

Dr. BRECKENRIDGE Robin, Muttensz, Svájc

Dr. CARDINAUX Francois, Seewen, Svájc

Dr. GOMBERT Frank, Huttingen, Németország

Dr. GRAM Hermann, Weil-Haltingen, Németország

Dr. RAMAGE Paul, Reinach, Svájc

Dr. SCHNEIDER Helmut, Freiburg, Németország

Dr. WAELCHLI Rudolf, Bazel, Svájc

Dr. ALBERT Rainer, Bazel, Svájc

Dr. LEWIS Ian, Riehen, Svájc

A bejelentés napja: 1993. 07. 06.

Elsőbbségei:

1992. 07. 15.	(92 15009.3)
1992. 12. 18.	(92 26415.9)
1992. 12. 23.	(92 26861.4),
1992. 12. 23.	(92 26859.8),
1993. 01. 28.	(93 01691.3),
1993. 01. 28.	(93 01692.1),
1993. 04. 14.	(93 07673.5),
1993. 04. 19.	(93 08033.1), Nagy-Britannia

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP93/01749

A nemzetközi közrebocsátás száma: WO 94/02510

80682-2703-tm

A találmány a paratiroid-hormon (PTH) változataira, azok előállítási eljárására, ilyen vegyületeket tartalmazó gyógyászati készítményekre és azok gyógyászati felhasználására vonatkozik.

Az itt használt "PTH" kifejezés a paratiroid-hormon genetikusan kódolt bármilyen alakjára vonatkozik, ideértve az adott gerinces fajok 84 aminosavat tartalmazó érett PTH-alakjait, pl. az ember, a disznó, a patkány, a szarvasmarha és a csirke PTH-ját, valamint azok fragmentumait, analógjait és PTH-szerű aktivitással rendelkező származékait. A PTH-szekvenciában az egyes aminosavak helyzetét a nemzetközileg elfogadott módszerrel számozzuk. Egyértelműség kedvéért és a konvenció szerint az alábbi leírásban ugyanazt a számozási módszert alkalmazzuk a PTH-szekvencia aminosavaira, függetlenül a molekula szubsztituenseitől.

Közelebbről a találmány PTH-szerű aktivitást mutató és legalább egy módosítást magában foglaló PTH-vegyületre vonatkozik, ahol a módosítás az alábbiak valamelyike lehet:

1. a PTH-vegyület terminális aminocsoportjához kapcsolódó legalább egy L- vagy D- α -aminosav-csoport, C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoport vagy adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkil-, C₂₋₈ alkenil-, C₂₋₈ alkinil-csoport, aralkilcsoport, aralkenilcsoport vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkilcsoport és/vagy a PTH-vegyület egy vagy több oldalláncához kapcsolódó legalább egy C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoport vagy adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkilcsoport, C₂₋₈ alkenilcsoport, C₂₋₈ alkinilcsoport, aralkilcsoport, aralkenilcsoport vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkilcsoport

vagy

2. a természetben előforduló PTH-szekvencia 1-38. helyzetében legalább egy α -aminosav egység, amely egy természetes vagy egy nem-természetes aminosavegységgel helyettesítve van, ahol az utóbbi aminosav egység adott esetben védett formában lehet, és így az 1-es és a 2-es helyzetben levő aminosavegységek a PTH-szekvencia aminosav-végcsoportján egy pszeudo-peptiddel lehetnek helyettesítve

vagy az ilyen módosulatok kombinációja,

azzal a megkötéssel, hogy

amikor a PTH-vegyület nem tartalmaz az N-végcsoportához kapcsolódó D- vagy L- α -aminosavat vagy C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoportot vagy adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkilcsoportot, C₂₋₈ alkenilcsoportot, C₂₋₈ alkinilcsoportot, aralkilcsoportot, C₂₋₈ alkinilcsoportot, aralkenilcsoportot vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkilcsoportot, nem lehet természetes α -aminosav-szekvenciával rendelkező PTH-vegyület;

vagy a PTH-vegyület nem lehet olyan (1-34)PTH származék, amelyben

- i. az 1-es helyzetű α -aminosav Gly, D-Ser, D-Ala vagy Tyr; vagy
- ii. a 2-es helyzetű α -aminosav Ala, D-Val, Lys, Arg vagy Cit és a 34-es helyzetű aminosav Tyr; vagy a 2-es helyzetű α -aminosav D-Val és a 34-es helyzetű α -aminosav D-Tyr és adott esetben a 8-as és a 18-as

- helyzetű α -aminosav Nle; vagy
- iii. a 3-as és/vagy 6-os és/vagy 9-es helyzetű α -aminosavat egy természetes vagy nem-természetes aminosav helyettesíti; vagy
 - iv. a 23-as helyzetű α -aminosavat Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Pro, Ser vagy Thr helyettesíti; vagy
 - v. a 25-ös és/vagy 26-as és/vagy 27-es helyzetű α -aminosavat Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr vagy Val helyettesíti; vagy
 - vi. a 8-as és a 18-as helyzetű α -aminosavak mindegyike Nle vagy Met(0) és adott esetben a 34-es helyzetű aminosav Tyr; vagy a 8-as és a 18-as helyzetű α -aminosavak mindegyike Nle és a 34-es helyzetű α -aminosav Tyr és vagy a 12-es helyzetű α -aminosav L- vagy D-Pro, L- vagy D-Ala, Aib vagy NMeGly, vagy pedig a 23-as helyzetű α -aminosav Phe, Leu, Nle, Val, Tyr, α -Nal vagy β -Nal; vagy
 - vii. a 28-as helyzetű α -aminosav Lys és a 30-as helyzetű α -aminosav Leu; vagy
 - viii. az 1-es helyzetű α -aminosav Aib; és/vagy a 8-as és/vagy 18-as helyzetű α -aminosav Leu, Ile, Val, Phe vagy Trp; és/vagy a 11-es helyzetű α -aminosav Ser, Lys, Phe, β -Nal, Trp vagy Tyr; és/vagy a 12-es helyzetű α -aminosav D-Leu, D-Ile, D-Nle, D-Val, D-Ser, D-Ser(Butil), D-Abu, D-Thr, D-Nva, D-Met, D- β -Nal, D-Trp, D-Lys, D-Tyr, D-Lys(Fmoc), D-Phe

vagy D-Asn; és/vagy a 13-as helyzetű α -aminosav
Leu; és/vagy a 19-es és/vagy 21-es helyzetű α -
aminosav Arg, Lys, Asn vagy His; és/vagy a 23-as
helyzetű α -aminosav 2-(1,3-ditiolán-2-il)Trp;
és/vagy a 25-ös helyzetű és/vagy 26-os helyzetű
 α -aminosav His; és/vagy a 27-es helyzetű α -aminosav
Gln vagy Leu; vagy

- ix. a 8-as és/vagy a 18-as helyzetű α -aminosav Ala vagy
Ser; vagy a 8-as és/vagy a 18-as helyzetű α -amino-
sav Ala, Val, Leu, Ile, Ser vagy Trp és a 34-es
helyzetű α -aminosav Tyr; vagy

a PTH-vegyület nem lehet olyan (1-84)PTH, amelyben

- i. az 1-es helyzetű α -aminosav Tyr, Val, Pro, Asp vagy
Cys; vagy
- ii. a 2-es helyzetű α -aminosav Ala, Glu, Leu, Ser vagy
Arg; vagy
- iii. a 3-as és/vagy a 6-os és/vagy a 9-es helyzetű α -
aminosavat egy természetes vagy nem-természetes
aminosav helyettesíti; vagy
- iv. a 23-as helyzetű α -aminosavat Ala, Arg, Asn, Asp,
Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Pro, Ser
vagy Thr helyettesíti; vagy
- v. a 25-ös és/vagy a 26-os és/vagy a 27-es helyzetű α -
aminosavat Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His,
Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr vagy Val
helyettesítit; vagy
- vi. a 8-as helyzetű α -aminosav Met, Met(0), Ala, Val,

Leu, Ile, Ser, Trp, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, Tyr vagy Gly és a 18-as helyzetű α -aminosav Leu; vagy a 8-as és/vagy a 18-as helyzetű α -aminosav Ala, Val, Leu, Ile, Ser vagy Trp, és adott esetben a 34-es helyzetű α -aminosav Tyr; vagy a 8-as és a 18-as helyzetű α -aminosavak mindegyike Met(0); vagy a 8-as helyzetű α -aminosav Leu és a 18-as helyzetű α -aminosav Met(0); vagy

vii. a 26-os helyzetű α -aminosav Gln;

a vegyület nem lehet Pro⁰PTH(1-84) vagy [Met⁰,Leu⁸,Leu¹⁸]PTH(1-84); vagy

a PTH-vegyület nem lehet (1-36)hPTH, ahol a 36-os helyzetű α -aminosav Leu;

szabad alakban vagy só alakjában vagy komplex alakban.

Amikor a PTH-szekvencia egy PTH-fragmentumból származik, az egy PTH-szerű aktivitású PTH-fragmens, amelynek legalább az első 27 N-terminálisa, előnyösen az első 38 N-terminálisa a PTH aminosavegységeinek felel meg, például 1-34 - 1-38, így 1-34 PTH, 1-36 PTH, 1-37 PTH vagy 1-38 PTH, ahol az α -aminosavak közül legalább egy a találmány szerinti módon van helyettesítve. A természetben előforduló PTH-szekvenciában rendes körülmények között jelenlevő egy vagy több α -aminosavegység hiányozhat is. Előnyösek a hPTH-fragmensek, különösen az (1-34)hPTH és az (1-36)hPTH.

A PTH-vegyületek C-végcsoportja lehet $-\text{COOH}$, észterezett $-\text{COOH}$, pl. $-\text{COOR}_a$, ahol R_a rövid szénláncú alkilcsoport, például C_{1-4} alkilcsoport, $-\text{CONH}_2$ csoport vagy egy mono- vagy diszubsztituált amidcsoport, pl. $-\text{CONR}_b\text{R}_c$ csoport lehet, ahol az R_b és az R_c csoportok egyikének a jelenetése hidrogénatom, míg a másik alifás csoport, pl. C_{1-6} alkilcsoport lehet, vagy pedig mind a kettő alifás csoport lehet, vagy R_b és R_c a hozzájuk kapcsolódó nitrogénatommal együtt heterociklusos csoportot, pl. pirrolidinil- vagy piperidinil-csoportot képeznek.

A továbbiakban ezeket a vegyületeket találmány szerinti vegyületekként fogjuk említeni.

A "természetes aminosavak" a szakmában ilyenként ismert aminosavakat jelentik, amelyeket szabványos rövidítéseikkel együtt az Amerikai Egyesült Államok Szabadalmi és Védjegy Hivatalának (U.S.P.T.O.) a hivatalos lapja (Trademark Official Gazette) 1990. május 15-én megjelent számának 33-46. oldalain közölnek. Ezeket az aminosavakat és azok rövidítéseit a jelen bejelentés leírását kiegészítő referenciaanyagnak tekintjük.

A természetes aminosavakat az alábbiakban soroljuk fel:

A	Ala	alanin
D	Asp	aszpartinsav
E	Glu	glutaminsav
F	Phe	fenil-alanin
G	Gly	glicin
H	His	hisztidin
I	Ile	izoleucin

K	Lys	lizin
L	Leu	leucin
M	Met	metionin
N	Asn	aszparagin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	szerin
T	Thr	treonin
V	Val	valin
W	Trp	triptofán
Y	Tyr	tirozin

A "nem-természetes aminosav" egység kifejezés genetikusan nem kódolt aminosav egységet jelent. A nem-természetes aminosav-egységek példáulként az alábbiakat említjük meg: a természetes α -aminosavak fentebb említett D-izomerjei, Aib (amino-izovajsav), bAib (3-amino-izovajsav), Nva (norvalin), β -Ala, Aad (2-amino-adipinsav), bAad (3-amino-adipinsav), Abu (2-amino-vajsav), Gaba (γ -amino-vajsav), Acp (6-amino-kapronsav), Dbu (2,4-diamino-vajsav), TMSA (trimetil-szilil-Ala), aIle (allo-izoleucin), Nle (norleucin), terc-Leu, Cit (citrullin), Orn, Dpm (2,2'-diamino-pimelinsav), Dpr (2,3-diamino-propionsav), α - vagy β -Nal, Cha (ciklohexil-Ala), hidroxiprolin, Sar (szarkozin) stb., ciklusos aminosavegységek és N^{α} -alkilezett aminosavegységek, pl. MeGly (N^{α} -metil-glicin), EtGly (N^{α} -etil-glicin), EtAsn (N^{α} -etil-aszparagin).

Védett alakú aminosav alatt természetes vagy nem-természetes olyan aminosavat értünk, amelynek például heteroatomot, így oxigén-, kén- vagy nitrogénatomot tartalmazó oldal-

lánca van, amely védett lehet egy O-, S- vagy N-védőcsoporttal. A találmány szerinti PTH-vegyületek N-végcsoportja védett formában is lehet.

Az aminosav-egységek N-védőcsoportján vagy oldalláncot képező aminocsoportjain jelenlevő N-védőcsoportok olyanok lehetnek, mint amilyeneket például T. W. Greene "Protective Groups in Organic Synthesis" (Védőcsoportok a szerves szintézisben) c. könyvének (J. Wiley & Sons, N.Y., 1981) 219-287. oldalain ismertetnek. E védőcsoportok példáulként az alábbiakat soroljuk fel: acilcsoportok, így formil-, acetil-, trifluor-acetil-, metoxi-szukcinil-, hidroxil-szukcinil- vagy benzoil-csoport, amely adott esetben a fenilgyűrűn szubsztituálva lehet pl. p-metoxi-karbonil-csoporttal, p-metoxi-csoporttal, p-nitrocsoporttal vagy p-fenilszulfonamido-karbonil-csoporttal; alkoxi-karbonil-csoportok, így t-butil-oxi-karbonil-csoport, izobutil-oxi-karbonil-csoport vagy metoxi-karbonil-csoport; allil-oxi-karbonil-csoport; tritil-csoport; 2,2,5,7,8-pentametil-kromán-6-szulfonil-csoport; aril-metoxi-karbonil-csoport, így 9-fluorenil-metoxi-karbonil-csoport vagy benzil-oxi-karbonil-csoport, amely a fenilgyűrűn adott esetben szubsztituálva lehet p-metoxi-csoporttal, p-nitrocsoporttal, o- vagy p-helyzetű klóratommal, m-fenil-csoporttal vagy 3,4-dimetil-csoporttal; aril-metil-csoport, így benzil-csoport, amely adott esetben a benzolgyűrűn szubsztituálva lehet p-metoxi-csoporttal, p-nitrocsoporttal vagy p-helyzetű klóratommal; vagy arilszulfonil-csoport, így fenilszulfonil-csoport, amely adott esetben a gyűrűn szubsztituálva lehet p-metil- vagy p-metoxicssoporttal; vagy naftilszulfonil-csoport,

amely adott esetben a gyűrűn szubsztituálva lehet pl. amino-csoporttal vagy di(C₁₋₄ alkil)-amino-csoporttal.

Az O-tartalmú oldalláncok O-védőcsoportjai olyanok lehetnek, mint amilyeneket pl. az E. Gross és J. Meienhofer kiadásában megjelent (1981) "The Peptides" (A peptidek) c. könyv 3. oldalán ismertetnek. Az alifás hidroxil-funkciók megfelelő O-védő csoportjai olyanok lehetnek, mint amilyeneket például J. M. Stewart "Protection of Hydroxy Groups" ("Hidroxilcsoportok védeése") c. könyvének a 169-201. oldalain ismertetnek, és amelyek például megemlítjük a benzilcsoportot, a terc-butilcsoportot és a metilcsoportot. Az aromás hidroxilcsoportok számára megfelelő O-védőcsoportok közül megemlítjük a benzilcsoportot, a terc-butilcsoportot, a metilcsoportot, a tozilcsoportot és a benzil-oxi-karbonil-csoportot. Az aminosavak oldalláncainak karboxilcsoportjai számára O-védő csoportok a jól ismert észtercsoportok, amelyeket például a fentebb említett "The Peptides" c. könyv 3. és 101-135. oldalain ismertetnek (R. W. Roeske: "Carboxyl Protecting Groups"), és amelyek közül a metilcsoportot, az etilcsoportot, a terc-butilcsoportot és a benzilcsoportot említjük meg. Az aminosavak oldalláncaiban levő tiolcsoportok S-védő csoportjai olyanok lehetnek, mint amilyeneket például a fentebb említett "The Peptides" c. könyv 3. és 137-167. oldalain írnak le (R. G. Hiskey: "Sulphydryl Group Protection"). Ilyen csoportok például megemlítjük a metilcsoportot, a terc-butilcsoportot, a benzilcsoportot, a p-metoxi-fenil-metilcsoportot, az etil-amino-karbonil-csoportot és a benzil-oxi-karbonil-csoportot.

A találmány szerinti PTH-vegyületek terminális aminocsoportjukon az alábbi csoportok közül legalább egyet hordozhatnak: L- vagy D- α -aminosav-csoport, C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoport és adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkil-csoport, C₂₋₈ alkenilcsoport, C₂₋₈ alkinilcsoport, aralkilcsoport, aralkenilcsoport vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoport és/vagy egy vagy több oldalláncbeli aminocsoporton az alábbi csoportok közül legalább egyet: C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoport és adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkilcsoport, C₂₋₈ alkenilcsoport, C₂₋₈ alkinilcsoport, aralkilcsoport, aralkenilcsoport vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoport. Amikor ilyen csoport csatlakozik egy oldalláncban levő aminocsoport-hoz, az utóbbi aminocsoport előnyösen egy Lys egység ϵ -aminocsoportja. Az alkil-, alkenil-, aralkil-, aralkenil- vagy cikloalkil-alkil-csoport előnyös szubsztituensei a hidroxil- és az aminocsoport, míg az arilcsoport szubsztituense halogénatom és/vagy C₁₋₄ alkoxics csoport lehet. Az alkilcsoport egyenes vagy elágazó szénláncú lehet, és adott esetben megszakíthatja egy oxigén-, kén- vagy nitrogénatom. A PTH-vegyület aminocsoportján levő C₁₋₈ alkilcsoport, C₂₋₈ alkenilcsoport, aralkilcsoport, aralkenilcsoport vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkilcsoport előnyösen nincs szubsztituálva. A C₁₋₈ alkilcsoport példáuliként megemlíti a C₁₋₆ alkilcsoportot, előnyösen a metilcsoportot, az etilcsoportot, a propilcsoportot, az izopropilcsoportot, a butilcsoportot, az izobutilcsoportot és a tercbutil-csoportot; a C₂₋₈ alkenilcsoport példaként megemlíti a C₂₋₄ alkenilcsoportot, előnyösen az allilcsoportot; a C₂₋₈ alkinilcsoport példaként megemlíti a C₂₋₄ alkinil-

csoportot, előnyösen a prop-2-inil-csoportot; az aralkilcsoport példáiként megemlítjük a fenilcsoportot vagy a benzilcsoportot; az aralkenil-csoport példájaként megemlítjük a sztirilcsoportot; a C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoport példájaként pedig a ciklohexil-metil-csoportot említjük meg. A C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoport előnyösen formil- vagy acetilcsoport lehet. Az N-végcsoportához kapcsolódó D- vagy L- α -aminosavak példáiként megemlítjük a D- vagy L- Pro- és Ala-csoportot. Az előnyös szubsztituensek közül megemlítjük az alkilcsoportot, az alkinilcsoportot, az alkoxi-karbonilcsoportot vagy a PTH-vegyület N-végcsoportjához kapcsolódó D- vagy L- α -aminosavat és/vagy az egy vagy több oldalláncbéli aminocsoportához kapcsolódó legalább egy alkilcsoportot vagy alkoxi-karbonil-csoportot.

A találmány szerinti PTH-vegyületek közül előnyösek azok, amelyek legalább egy aminosav-egységet tartalmaznak a PTH-szekvencia alábbi helyzeteiben: 1, 2, 3, 8-11, 13-19, 21, 22, 29-34, különösen a 8-11, 16-19, 33 és/vagy 34 helyzetekben. A találmány szerinti PTH-vegyületek közül továbbá azok is előnyösek, amelyek egynél több aminosav-egységet tartalmaznak, különösen kettőnél több aminosav-egységet, még előnyösebben háromnál több aminosav-egységet, különösen előnyösen 5-7 aminosav-egységet tartalmaznak a PTH-szekvencia fentebb felsorolt helyzeteinek bármilyen kombinációjában.

A találmány szerinti PTH-vegyületek egy előnyös csoportja esetén a PTH-szekvencia amino-végcsoportja mellett egyes és kettes helyzetben az α -aminosavakat egy pszeudo-dipeptid helyettesíti. A "pszeudo-dipeptid" kifejezés olyan dipeptid

izoszterre vonatkozik, amelyben természetes vagy nem-természetes két aminosavmaradék közötti peptidkötést egy izoszter csoport, például $-\text{CH}_2-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{halogén})=\text{CH}-$ vagy $-\text{C}(\text{alkil})=\text{CH}-$ csoport helyettesít.

Az olyan, találmány szerinti vegyületek példáiként, amelyekben az 1-es és a 2-es helyzetű α -aminosavakat pszeudodipeptid helyettesíti, például a (I) általános képletű vegyületeket adjuk meg - ahol

X jelentése (a) általános képletű csoport vagy (b) általános képletű csoport, amely képletekben

Z és Z' jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom;

adott esetben szubsztituált C_{1-8} alkilcsoport,

C_{2-8} alkenilcsoport, aralkilcsoport, aralkenil-

csoport vagy C_{3-6} cikloalkil- C_{1-4} alkil-csoport;

vagy védőcsoport, és itt megjegyezzük, hogy Z és Z' egyike többnyire védőcsoport;

Z" jelentése hidrogénatom, C_{1-8} alkilcsoport vagy védőcsoport;

Y és Y' jelentése egymástól függetlenül egy természetes vagy egy nem-természetes α -aminosav adott esetben védett oldallánca;

Y_a és Y_b közül az egyiknek a jelentése hidrogénatom, míg a másik egy természetes vagy nem-természetes α -aminosav adott esetben védett oldallánca, vagy pedig Y_a és Y_b a hozzájuk csatlakozó szénatommal együtt C_{3-6} cikloalkilcsoportot képeznek;

és

W jelentése halogénatom vagy C_{1-4} alkilcsoport,

vagy

W és Y' azzal a $\text{-}\underset{|}{\text{C}}=\underset{|}{\text{CH}}\text{-}\underset{|}{\text{CH}}\text{-}$ csoporttal együtt, amely-
hez kapcsolódnak, adott esetben szubsztituált
aromás gyűrűt vagy heteroaromás csoportot képeznek;
és

P₁ egy fentebb meghatározott olyan PTH-szekvencia, amelyben
az N-végcsoport melletti 1-es és 2-es helyzetű aminosav-egy-
ségek hiányzanak -

szabad alakban vagy só alakban vagy komplex alakban.

A (I) általános képletű vegyületekben P₁ jelentése a PTH
(3-z) fragmense lehet, ahol z jelentése 84 vagy egy 27-től
38-ig terjedő egész szám, előnyösen 34-38, még előnyösebben
34, 36, 37 vagy 38, különösen előnyösen 34 vagy 36. A P₁
képletű PTH-szekvencia megfelelhet egy természetes PTH-szek-
venciának vagy pedig egy olyan természetes PTH-szekvenciának,
amelyben legalább az egyik α-aminosav-egységet egy termé-
szetes vagy nem-természetes aminosav helyettesíti adott eset-
ben védett alakban és/vagy amelyben egy vagy több α-aminosav-
egység hiányzik. A P₁ képletű PTH-szekvencia legalább egy
olyan, oldalláncban levő aminosav-csoportot is magában
foglalhat, amely a fenti módon van helyettesítve.

A "halogén" megjelölés jelentése előnyösen fluoratom vagy
klóratom.

Az (a) általános képletű csoportban a kettős kötés elő-
nyösen transz(E) konfigurációjú.

A természetes α-aminosavak α-szénatomjához kapcsolódó Y,
Y', Y_a vagy Y_b csoport egy természets α-aminosavban jelenle-
vő, fentebb felsorolt oldallánc lehet, például olyan oldal-

lánc, mint amely a Gly-ben van jelen (vagyis H), vagy amilyen az Ala, Val, Ser, Leu, Ile, Phe vagy Trp csoportokban van jelent. Y, Y', Y_a vagy Y_b jelentése egy nem-természetes α -aminosav α -szénatomjához kapcsolódó, fentebb jelzett csoport is lehet, például olyan csoport, mint amilyen az Nva, Orn, Abu, Aib vagy Nle csoportokban van jelen. Ha a természetes vagy nem-természetes aminosavak Y, Y', Y_a vagy Y_b képletű oldallánca heteroatomot, így például oxigén-, kén- vagy nitrogénatomot tartalmaz, az oldalláncban levő heteroatomok adott esetben védve lehetnek O-, S- vagy N-védőcsoporttal, például a fentebb ilyen vonatkozásban említett csoportok valamelyikével.

A Z vagy Z' vagy Z'' védőcsoportok a fentebb ismertetett csoportok lehetnek. Ha a Z vagy Z' vagy Z'' szubsztituens jelentése C₁₋₈ alkilcsoport, ennek előnyös jelentése megegyezhet a fentebb ilyen vonatkozásban ismertetettekkel.

Z vagy Z' jelentése előnyösen hidrogénatom vagy C₁₋₄ alkilcsoport, előnyösen hidrogénatom vagy metilcsoport.

Y jelentése előnyösen hidrogénatom vagy metilcsoport.

Ha W jelentése C₁₋₄ alkilcsoport, ez a jelentés előnyösen metilcsoport.

Ha W és Y' azzal a csoporttal együtt, amelyhez kapcsolódnak, adott esetben szubsztituált aromás ciklusos vagy heterociklusos csoport, ez a csoport adott esetben egy vagy két nitrogén-, kén- vagy oxigénatomot tartalmazó, 5- vagy 6-tagú aromás gyűrűs csoport lehet, például fenilcsoport, imidazolilcsoport, piridilcsoport, oxazolilcsoport vagy tiazolilcsoport. Előnyös szubsztituens a hidroxil- vagy a metoxicssoport,

különösen a fenilgyűrűn.

Y' jelentése előnyösen hidrogénatom, metilcsoport, izopropilcsoport vagy benzilcsoport.

Ha Z'' jelentése C_{1-8} alkilcsoport, ez előnyösen metil-, etil- vagy izopropilcsoport lehet.

Ha Y_a és Y_b együttes jelentése C_{3-6} cikloalkilcsoport, ez előnyösen ciklopropil- vagy ciklopentilcsoport lehet.

Amikor Z'' jelentése védőcsoport, ez előnyösen acilcsoport, különösen acetilcsoport lehet.

A találmány szerinti PTH-vegyületek egy előnyös kiviteli alakja esetén a PTH-szekvencia N-végcsoportjának 1-es helyzetű α -aminosav-egységét és/vagy 2-es helyzetű α -aminosav-egységét egy adott esetben védett természetes vagy nem-természetes aminosav-csoport helyettesíti, feltéve, hogy

amikor a PTH-vegyület mentes az N-végcsoportához kapcsolódó D- vagy L- α -aminosavtól vagy C_{2-6} alkoxi-karbonil-csoporttól vagy adott esetben szubsztituált C_{1-8} alkilcsoporttól, C_{2-8} alkenilcsoporttól, C_{2-8} alkinilcsoporttól, aralkilcsoporttól, aralkenilcsoporttól vagy C_{3-6} cikloalkil- C_{1-4} alkilcsoporttól, akkor a PTH-vegyület nem tartalmaz természetben előforduló α -aminosav-szekvenciát;

vagy a PTH-vegyület nem lehet olyan (1-34)PTH, amelyben

- i. az 1-es helyzetű α -aminosav Aib, Gly, D-Ser, D-Ala vagy Tyr; vagy
- ii. a 2-es helyzetű α -aminosav Ala, D-Val, Lys, Cit vagy Arg és a 34-es helyzetű α -aminosav Tyr; vagy a 2-es

helyzetű α -aminosav D-Val és a 34-es helyzetű α -aminosav D-Tyr és a 8-as és a 18-as helyzetű aminosavak mindegyike Nle; vagy

- iii. az 1-es helyzetű α -aminosav Aib és legalább egy további α -aminosav-egység az alábbi módon van helyettesítve: a 8-as és/vagy 18-as helyzetű α -aminosav Leu, Ile, Val, Phe vagy Trp és/vagy a 11-es helyzetű α -aminosav Ser, Lys, Phe, β -Nal, Trp vagy Tyr és/vagy a 12-es helyzetű α -aminosav D-Leu, D-Ile, D-Nle, D-Val, D-Ser, D-Ser(butil), D-Abu, D-Thr, D-Nva, D-Met, D- β -Nal, D-Trp, D-Lys, D-Tyr, D-Lys(Fmoc), D-Phe vagy D-Asn és/vagy a 13-as helyzetű α -aminosav Leu és/vagy a 19-es és/vagy 21-es helyzetű α -aminosav Arg, Lys, Asn vagy His és/vagy a 23-as helyzetű α -aminosav 2-(1,3-ditiolan-2-il)Trp és/vagy a 25-ös helyzetű és/vagy 26-os helyzetű α -aminosav His és/vagy a 27-es helyzetű α -aminosav Gln vagy Leu,
- vagy a PTH-vegyület nem lehet olyan (1-84)PTH vegyület, amelyben

- i. az 1-es helyzetű α -aminosav Tyr, Val, Pro, Asp vagy Cys; vagy
- ii. a 2-es helyzetű α -aminosav Ala, Glu, Leu, Ser vagy Arg.

A találmány szerinti vegyületek egy további előnyös kiviteli alakja, amelyben az 1-es és/vagy a 2-es helyzetű α -aminosavak a fentebb jelzett módon vannak helyettesítve,

magukban foglalják például a (II) általános képletű vegyületeket, ahol

X_{1a} jelentése adott esetben védett természetes α -aminosav csoport vagy (IIa) általános képletű csoport, ahol

Z_a és Z'_a jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, C_{1-6} alkilcsoport vagy egy védőcsoport, de Z_a és Z'_a közül csak az egyik lehet védőcsoport, és **vagy** n jelentése 1 és

- i. R_1 és R_2 jelentése egymástól függetlenül C_{1-6} alkilcsoport vagy
- ii. R_1 és R_2 közül az egyik metil- vagy etilcsoportot jelent, míg a másik jelentése egy természetes α -aminosav α -szénatomjához kapcsolódó, adott esetben védett csoport, ahol a természetes α -aminosav nem lehet Ala, Leu, Ile vagy Val, vagy
- iii. R_1 és R_2 közül az egyiknek a jelentése hidrogénatom, metilcsoport vagy etilcsoport, míg a másiknak a jelentése egy nem-természetes α -aminosav α -szénatomjához kapcsolódó, adott esetben védett csoport, vagy
- iv. R_1 és R_2 a szomszédos szénatommal együtt C_{3-6} cikloalkilcsoportot jelent, vagy
- v. a (c) általános képletű csoport olyan heterociklusos csoportot jelent, amely adott esetben egy benzolgyűrűvel van kondenzálva,

vagy n jelentése 2, 3, 4 vagy 5, és R_1 , valamint R_2 jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport,

Y_{2a} jelentése adott esetben védett természetes α -aminosav vagy

(IIb) általános képletű csoport, amelyben

Z_b jelentése hidrogénatom vagy C_{1-6} alkilcsoport és
 m jelentése **vagy** 1 és

- i. R_3 és R_4 jelentése egymástól függetlenül C_{1-6} alkilcsoport vagy
- ii. R_3 és R_4 közül az egyiknek a jelentése metilcsoport vagy etilcsoport, míg a másiknak a jelentése egy természetes α -aminosav α -szénatomjához kapcsolódó, adott esetben védett csoport, ahol a természetes α -aminosav nem lehet Ala, Leu, Ile vagy Val, vagy
- iii. R_3 és R_4 közül az egyiknek a jelentése hidrogénatom, metilcsoport vagy etilcsoport, míg a másik egy nem-természetes α -aminosav α -szénatomjához kapcsolódó, adott esetben védett csoport,

vagy m jelentése 2, 3, 4 vagy 5, míg R_3 és R_4 jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport, és

P_2 egy olyan, fentebb meghatározott PTH-szekvencia, amelyben az N-végcsoport melletti 1-es és/vagy 2-es helyzetű aminosav-egységek hiányzanak.

Amikor a (c) általános képletű csoport jelentése olyan heterociklusos csoport, amely egy benzolgyűrűvel adott esetben kondenzálva van, ez a csoport egy vagy több nitrogén-, oxigén- vagy kénatomot tartalmazó, telített vagy telítetlen, 5- vagy 6-tagú heterociklusos csoport lehet. Az ilyen heterociklusos csoport példáiként megemlítjük a 2-piridil-csoportot, a 3-morfolinil-csoportot, a hexahidropiridazinilcsoportot, valamint a 2- és 3-indolil-csoportot.

Amikor n vagy m egynél nagyobb számot jelent, a CR_1R_2 vagy CR_3R_4 csoport jelentése $-CH(CH_3)-CH_2-$ csoport, propilcsoport, butilcsoport vagy pentilcsoport lehet.

Amikor R_1 és R_2 jelentése együtt C_{3-6} cikloalkilcsoport, ez előnyösen ciklopropilcsoport vagy ciklopentilcsoport lehet.

Egy természetes α -aminosav α -szénatomjához kapcsolódó csoportként R_1 , R_2 , R_3 vagy R_4 egy fentebb felsorolt természetes α -aminosav oldallánca lehet, például amilyen a Gly, Ser vagy Thr aminosavcsoportokban van jelen. Az R_1 és R_2 vagy az R_3 és R_4 szubsztituensek közül az egyik metilcsoport vagy etilcsoport lehet, míg a másik metilcsoport, izopropilcsoport, izobutilcsoport vagy $CH_3-CH_2-CH(CH_3)-$ csoport lehet. R_1 , R_2 , R_3 vagy R_4 egy fentebb felsorolt nem-természetes α -aminosav α -szénatomjához kapcsolódó csoport is lehet, például olyan csoport, mint amilyen az Abu, Gaba, Nva, Aib, TMSA vagy Nle aminosavcsoportokban van jelen. Ha a természetes vagy nem-természetes aminosavak R_1 , R_2 , R_3 vagy R_4 oldallánca heteroatomokat, így oxigén-, kén- vagy nitrogénatomot foglal magában, az oldalláncban levő heteroatomok adott esetben védettek lehetnek O-, S- vagy N-védőcsoporttal, például a fentebb felsorolt csoportokkal. A Z_a vagy Z'_a védőcsoport a fentebb felsorolt védőcsoportok valamelyike lehet. A Z_b szubsztituens C_{1-6} alkilcsoport jelentése előnyösen metilcsoport vagy etilcsoport. Z_b előnyös jelentése hidrogénatom. Ha Z_a vagy Z'_a jelentése C_{1-6} alkilcsoport, ez előnyösen egyenes vagy elágazó szénláncú C_{1-4} alkilcsoport lehet. Z_a és Z'_a közül az egyiknek a jelentése előnyösen hid-

rogénatom, míg a másiknak az előnyös jelentése hidrogénatom, C₁₋₄ alkilcsoport vagy védőcsoport, de különösen előnyös jelentés a hidrogénatom.

A találmány szerinti PTH-vegyületek egy további előnyös változatában az α -aminosav-egységet 8-as helyzetben és/vagy 18-as helyzetben egy adott esetben védett természetes vagy nem-természetes aminosavcsoport helyettesíti, feltéve, hogy

amikor a PTH-vegyület mentes az N-végcsoportához kapcsolódó D- vagy L- α -aminosavtól vagy C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoporttól vagy adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkilcsoporttól, C₂₋₈ alkenilcsoporttól, C₂₋₈ alkinilcsoporttól, aralkilcsoporttól, aralkenilcsoporttól vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoporttól, akkor nem lehet a természetben előforduló α -aminosav-szekvenciával rendelkező PTH-vegyület;

vagy a PTH-vegyület nem lehet olyan (1-34)PTH, amelyben

- i. a 8-as és a 18-as helyzetű α -aminosavak közül mindkettő Nle vagy mindkettő Met(0) és adott esetben a 34-es helyzetű α -aminosav Tyr; vagy a 8-as és a 18-as helyzetű aminosavak közül mindkettő Nle és a 34-es helyzetű α -aminosav Tyr, és a 12-es helyzetű α -aminosav L- vagy D-Pro, L- vagy D-Ala, Aib vagy NMeGly, vagy pedig a 23-as helyzetű α -aminosav Phe, Leu, Nle, Val, Tyr, α -Nal vagy β -Nal; vagy a 8-as és a 18-as helyzetű α -aminosavak közül mindkettő Nle és a 2-es helyzetű α -aminosav D-Val és a 34-es hely-

zetű α -aminosav D-Tyr; vagy

- ii. a 8-as és/vagy 18-as helyzetű α -aminosav Leu, Ile, Val, Phe vagy Trp és adott esetben legalább egy további α -aminosav-egység az alábbi módon van kicserélve: az 1-es helyzetű α -aminosav Aib és/vagy a 11-es helyzetű α -aminosav Ser, Lys, Phe, β -Nal, Trp vagy Tyr és/vagy a 12-es helyzetű α -aminosav D-Leu, D-Ile, D-Nle, D-Val, D-Ser, D-Ser(butil), D-Abu, D-Thr, D-Nva, D-Met, D- β -Nal, D-Trp, D-Lys, D-Tyr, D-Lys(Fmoc), D-Phe vagy D-Asn és/vagy a 13-as helyzetű α -aminosav Leu és/vagy a 19-es helyzetű és/vagy 21-es helyzetű α -aminosav Arg, Lys, Asn vagy His és/vagy a 23-as helyzetű α -aminosav 2-(1,3-ditiolán-2-il)Trp és/vagy a 25-ös helyzetű és/vagy 26-os helyzetű α -aminosav His és/vagy a 27-es helyzetű α -aminosav Gln vagy Leu; vagy
 - iii. a 8-as és/vagy 18-as helyzetű α -aminosav Ala vagy Ser; vagy a 8-as és/vagy 18-as helyzetű α -aminosav Leu és/vagy a 34-es helyzetű α -aminosav Tyr; vagy
- a PTH-vegyület nem lehet olyan (1-84)PTH, amelyben
- a 8-as helyzetű α -aminosav Met, Met(0), Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Trp, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, Tyr vagy Gly és a 18-as helyzetű α -aminosav Leu; vagy a 8-as helyzetű és a 18-as helyzetű aminosavak mindegyike Met(0); vagy a 8-as helyzetű α -aminosav Leu és a 18-as helyzetű α -aminosav Met(0); vagy
- a PTH-vegyület nem lehet [Leu¹⁸,Tyr³⁴](1-84)hPTH,
- [Leu⁸,Tyr³⁴](1-84)hPTH, [Ile⁸,Leu¹⁸,Tyr³⁴](1-84)hPTH

vagy [Leu⁸,Leu¹⁸,Tyr³⁴](1-84)hPTH.

Amikor a 8-as helyzetű α -aminosav-egységet nem-természetes aminosav helyettesíti, az utóbbi a fentebb ismertetett nem-természetes aminosavak bármelyike lehet, például Nva, Nle vagy Cha. Előnyösen ez egy nem-természetes lipofil aminosav, amely előnyösen egyenes szénláncú alkilcsoportot tartalmaz.

Az Nva (norvalin) és homológjai különösen előnyösek. A PTH-szekvencia 8-as helyzetében levő nem-természetes aminosav α -metilezett vagy α -etilezett természetes α -aminosav is lehet.

A találmány szerinti PTH-vegyületek olyan példáiként, ahol a 18-as helyzetű α -aminosav ki van cserélve, megemlítjük az olyan PTH-vegyületeket, amelyekben a 18-as helyzetű α -aminosav-maradék természetes aminosavmaradéokra van kicserélve, például Gln-, Tyr- vagy Lys-csoportra; ilyen vegyületek például a [Gln¹⁸]-PTH, a [Lys¹⁸]-PTH és a [Tyr¹⁸]-PTH, különösen a [Gln¹⁸ vagy Lys¹⁸ vagy Tyr¹⁸](1-x)hPTH, ahol x jelentése 84 vagy egy 27-től 38-ig terjedő egész szám, különösen 34-től 38-ig terjedő egész szám. A 18-as helyzetű Ala szintén előnyös, különösen amikor a PTH-szekvencia egy (1-36) PTH-fragmentum. Ezekben a vegyületekben a 8-as helyzetű aminosav Met lehet, vagy pedig az alábbi aminosavak: Leu, Ile, Val, Phe, Gln, Trp, Ser és Ala közül valamelyik helyettesítheti, vagy pedig egy nem-természetes lipofil aminosav-maradék, például Nva vagy Nle lehet.

A találmány szerinti ilyen PTH-vegyületek egy másik csoportjába például azok a PTH-vegyületek tartoznak, amelyekben a 8-as helyzetű aminosav-maradékot egy nem-természetes lipof-

fil aminosav-maradék helyettesíti, például Nle vagy előnyösebben Nva. Ezekben a vegyületekben a 18-as helyzetű aminosav Met lehet, vagy pedig azt az alábbi aminosavak egyike helyettesítheti: Leu, Ile, Val, Phe, Trp, Ser, Ala, Gln, Lys vagy Tyr, előnyösen Leu, Gln, Ala vagy Tyr.

A találmány szerinti ilyen PTH-vegyületek egy további csoportjába azok a vegyületek tartoznak, amelyekben a fennmaradó helyzetekben, például az 1-7-es, 9-17-es és/vagy 19-38-as helyzetekben egy vagy több aminosav-egység vagy hiányzik, vagy pedig ki van cserélve amellet, hogy a 8-as és/vagy 18-as helyzetű α -aminosav-egység is ki van cserélve. Ilyen esetben a 8-as helyzetű α -aminosav előnyösen Leu-csoportra van kicserélve és a 18-as helyzetű α -aminosav Gln, Leu, Ala vagy Tyr.

A találmány vonatkozik továbbá olyan PTH-vegyületekre is, amelyekben a PTH-szekvencia legalább egyik α -aminosav-egysége olyan α -aminosav-egységre van kicserélve, amely a PTHrP-ben a megfelelő helyzetében van jelen, feltéve, hogy amikor a PTH-vegyület mentes az N-végcsoportához kapcsolódó D- vagy L- α -aminosavtól vagy C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoporttól vagy adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkil-, C₂₋₈ alkenil-, C₂₋₈ alkinil-, aralkil-, aralkenil- vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoporttól, nem lehet természetben előforduló α -aminosav-szekvenciával rendelkező PTH-vegyület; vagy a PTH-vegyület nem lehet olyan (1-34)PTH, amelyben

- i. a 8-as és/vagy a 18-as helyzetű α -aminosav Leu; és/vagy a 11-es helyzetű α -aminosav Lys; és/vagy a 19-es és/vagy 21-es α -aminosav Arg; és/vagy a

25-ös és/vagy 26-os helyzetű α -aminosav His; és/vagy
a 27-es helyzetű α -aminosav Leu; vagy

- ii. a 25-ös helyzetű α -aminosav Gln és/vagy a 26-os
helyzetű α -aminosav Asn, és a 27-es helyzetű α -
aminosav adott esetben Leu; vagy

a PTH-vegyület nem lehet [Leu⁸,Leu¹⁸](1-84)PTH.

A "PTHrP" kifejezés a PTHrP genetikusan kódolt bármilyen alakjára, például az emberi, a csirke-, a patkány- vagy az egér-PTHrP-re vonatkozik. Egyértelműség kedvéért és a nemzetközi szokásnak megfelelően az alábbi leírásban ugyanazt a számozási rendszert fogjuk alkalmazni a PTHrP-szekvencia aminosavaira, ahol az 1-es helyzetben Ala és a 38-as helyzetben például Ala van.

A találmány szerinti vegyületeknek ebbe a csoportjába a PTH és a homológ PTHrP-szekvenciák közötti hibridek tartoznak (amelyeket a továbbiakban "PTH-rP hibridek"-ként fogunk említeni). Az az aminosav-szekvencia, amelyben a találmány szerinti szubsztitúció végbemegy, az 1-es helyzettől a 38-as helyzetig, különösen az 1-es helyzettől a 36-os helyzetig, előnyösen az 1-es helyzettől a 34-es helyzetig terjed.

A találmány szerinti PTH-vegyületek közül előnyösek az olyan PTH-rP hibridek, amelyekben a PTH-szekvencia egynél több α -aminosav-egységét, például legalább két, előnyösen 3-5 α -aminosav-egységét a találmány szerint kicseréljük.

A találmány szerinti PTH-rP hibridek egy előnyös csoportjába olyan PTH-vegyületek tartoznak, amelyekben a 8-11-es helyzetű PTH α -aminosav-szekvencia legalább egy α -aminosav-egységét, vagyis a Met⁸, His⁹, Asn¹⁰ vagy Leu¹¹ egységét a

PTHrP megfelelő szekvenciájának megfelelő α -aminosav-egysége, vagyis Leu⁸, His⁹, Asp¹⁰ vagy Lys¹¹ helyettesíti. Előnyös a 8-as és/vagy 10-es helyzetű helyettesítés, különösen a 8-as és a 10-es helyzetű helyettesítés. Még előnyösebb, amikor a PTH-szekvencia 8-as, 10-es és 11-es helyzetű α -aminosavai vannak helyettesítve Leu⁸, Asp¹⁰, ill. Lys¹¹ csoportokkal.

A találmány szerinti PTH-rP hibridek egy másik előnyös csoportjában a 16-19-es helyzetű PTH α -aminosav-szekvencia legalább egy α -aminosav egysége a PTHrP megfelelő szekvenciájának megfelelő α -aminosav-egységére, vagyis Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹ csoportra van kicserélve. Előnyösen az említett szekvencia három α -aminosav-egysége vagy mind a négy ilyen egysége ki van cserélve. Különösen előnyösek az olyan PTH-vegyületek, amelyekben a 16-os helyzetű α -aminosav Gln, a 18-as helyzetű α -aminosav Leu és a 19-es helyzetű α -aminosav Arg.

A találmány szerinti PTH-rP hibridek egy további előnyös csoportjába olyan vegyületek tartoznak, amelyekben a 33-as és 34-es helyzetű PTH α -aminosav-szekvencia legalább egy α -aminosav-egysége a PTHrP megfelelő szekvenciájának megfelelő α -aminosav-egységére, vagyis THR³³ és Ala³⁴ egységre van kicserélve. Előnyös, ha mindkét α -aminosav ki van cserélve.

A találmány szerinti PTH-rP hibridek egy további előnyös csoportjába olyan PTH-vegyületek tartoznak, amelyek a fentebb említett α -aminosav-szubsztitúciók bármilyen kombinációját (8-11, 16-19, 33-34) tartalmazzák; különösen előnyös a 8-11 és a 33-34 szubsztitúciók kombinációja.

A találmány szerinti PTH-rP hibridekben az 1-38-helyzetű

α -aminosavak tovább lehetnek helyettesítve egy vagy több fentebb említett természetes vagy nem-természetes aminosav-egységgel, de közülük egy vagy több hiányozhat is. A 10-es helyzetben az alábbi csoportba tartozó α -aminosav lehet: Gly, Gln, Glu, His, Ser, Thr vagy Tyr. A 13-as helyzetben Arg-tól eltérő D- vagy L- α -aminosav lehet, például Ala, Cys, Gln, Ile, Asn, Trp, Asp, Val, Ser, Thr, Tyr, Met Leu vagy Gly; a 16-os helyzetben D- vagy L- α -aminosav lehet, például Lys, Ser, Leu, Ala, Gln vagy Gly; a 17-es helyzetben Ala vagy Ser vagy előnyösen olyan aminosav lehet, amelynek nagyobb az oldallánca, mint az Ala vagy a Ser, például Glu, Gln, Phe, His, Ile vagy Lys; a 18-as helyzetben Gln vagy Tyr lehet; a 19-es helyzetben Ala, Arg, Val, Tyr, Ser, Lys, Met, His, Gly, Pro, Asn vagy Ile lehet; a 26-os helyzetben Gln vagy Arg lehet; és/vagy a 33-as helyzetben egy D- vagy L- α -aminosav lehet, például Ser, Thr, Leu, Gly, Gln, Arg, Pro, Asp, Ile, Lys vagy Thr. A találmány szerinti PTH-rP hibridek az N-végcsoporton vagy egy oldallánc-aminosavon a fentebbi módon szubsztituálva is lehetnek. Kívánt esetben a találmány szerinti PTH-rP hibridek kénatomot vagy oxigénatomot tartalmazó oldalláncai a fentebbi módon védettek is lehetnek.

A találmány szerinti PTH-rP hibridek példáiként az alábbiakat említjük meg: [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]PTH, [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]PTH, [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]PTH, [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]PTH, [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]PTH, [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]PTH, [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]PTH, [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]PTH és

[Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]PTH.

A találmány szerinti PTH-rP hibridek előnyös képviselői közé tartoznak azok az $(1-x')$ PTH vegyületek, amelyekben x' jelentése 34-től 38-ig terjedő egész szám, előnyösen 34, 36, 37 vagy 38, különösen az olyan $(1-x')$ hPTH vegyületek, amelyekben egy vagy több aminosavat a PTH-rP megfelelő helyzeteiben levő α -aminosav(ak) helyettesít(enek), előnyösen a fentebb ismertetett aminosavak. Amikor a 33-as és a 34-es helyzetet a PTH-rP megfelelő α -aminosav-szekvenciája helyettesíti, a PTH-vegyület előnyösen olyan hPTH-fragmentum, amely 34 α -aminosav-egységet tartalmaz. Előnyösek a karboxil-végcsoporttal rendelkező PTH-rP hibridek.

A PTHrP előnyösen hPTHrP.

A találmány szerinti vegyületek például szabad alakban, só-alakban vagy komplexek alakjában létezhetnek. Savaddíciós sókat például szerves savakkal, polimer savakkal és szervetlen savakkal képezhetünk. Ilyen savaddíciós sók lehetnek például a hidrokloridok és az acetátok. Komplexeket például úgy képezhetünk a találmány szerinti vegyületekből, hogy szervetlen anyagokat, például szervetlen sókat vagy hidroxidokat, így kalcium- és cinksókat és/vagy polimer szerves anyagokat adunk hozzájuk.

A találmány kiterjed a találmány szerinti vegyületek előállítására is. A vegyületeket előállíthatjuk lépésenként vagy oldatban, vagy pedig a szilárd fázisú szintézis módszerét vagy géntechnológiai módszert alkalmazva.

A találmány szerinti vegyületeket például az alábbi módon állíthatjuk elő:

- a) a védett formában levő, találmány szerinti vegyületnek legalább egy védőcsoportját eltávolítjuk; vagy
 - b) két peptid-fragmentumot egy amidkötéssel összekapcsolunk, ahol a peptid-fragmentumok olyanok, hogy a kívánt vegyület kívánt aminosav-szekvenciáját kapjuk, majd adott esetben végrehajtjuk az a) lépést;
 - c) olyan PTH-vegyület előállítása céljából, amelyben az amino-végcsoport melletti 1-es és 2-es helyzetben az α -aminosav-egységeket pszeudo-dipeptid helyettesíti, egy védett vagy nem-védett pszeudo-dipeptidet egy védett vagy nem-védett formában levő olyan PTH-peptiddel reagáltatunk, amelyben hiányzik az 1-es és a 2-es helyzetű aminosav-maradék, és kívánt esetben végrehajtjuk az a) lépést; vagy
 - d) olyan PTH-vegyület előállítása céljából, amely legalább egyet tartalmaz az alábbi csoportok közül: az N-végcsoportához kapcsolódó D- vagy L- α -aminosav-csoport, C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoport és az amino végcsoportához kapcsolódó, adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkil-, C₂₋₈-alkenil-, C₂₋₈ alkinil-, aralkil-, aralkenil- vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoport és/vagy az oldalláncban levő aminocsoportához kapcsolódó D- vagy L- α -aminosav, egy ilyen csoportot bevezetünk egy PTH-vegyületbe, amely mentes az ilyen csoporttól és amely védett vagy nem-védett alakban lehet, és kívánt esetben lefolytatjuk az a) lépést;
- és az így kapott vegyületet szabad alakban, só alakjában vagy komplex alakban elkülönítjük.

Az a), b) és c) eljárási lépéseket az ismert módszerekhez hasonlóan folytathatjuk le, például a peptidkémiai ismert módon, vagy pedig az alábbi példákban ismertetett módon. Ha kívánatos, ezekben a reakciókban a peptidkémiai szokásos olyan védőcsoportokat használhatunk, amelyek a reakcióban részt nem vevő funkciós csoportok esetén használhatók. A "védőcsoport" kifejezés funkciós csoportokkal rendelkező polimer gyantákat is magában foglal.

A b) eljárási lépésben, ha olyan PTH-vegyületet állítunk elő, amelyben az amino végcsoport melletti 1-es és 2-es helyzetű α -aminosav-egységeket pszeudo-dipeptid helyettesíti, a kiindulási anyagként használt peptid-fragmentum magában foglalhatja a pszeudo-dipeptidet a vegyület N-végcsoportjánál. Ezt a kiindulási anyagot a c) eljárási lépés szerint állíthatjuk elő.

A c) eljárási lépésben a kiindulási vegyületként használt pszeudo-dipeptid egy (IIaa) vagy (IIbb) általános képletű vegyület lehet, ahol Y, Y', Y_a, Y_b, Z, Z', Z" és W jelentése a fenti, de felhasználhatjuk e vegyületek funkciós származékait, például észterét, savhalogenidjét vagy szimmetrikus vagy aszimmetrikus anhidridjét is. Az olyan (IIaa) általános képletű vegyületek, amelyekben W és Y' a hozzájuk kapcsolódó $\text{-}\underset{|}{\text{C}}=\underset{|}{\text{CH}}\text{-}\underset{|}{\text{CH}}\text{-}$ molekularésszel együtt egy adott esetben szubsztituált aromás vagy heterociklusos gyűrűt képeznek, továbbá az olyan (IIbb) általános képletű vegyületek, amelyekben Z" jelentése alkilcsoport vagy védőcsoport, például acetyl-csoport, vagy ahol $\text{-CY}_a\text{Y}_b$ jelentése C₃₋₆ cikloalkilcsoport és Z" jelentése hidrogénatom, újak és a találmány részét képe-

zik.

A d) eljárási lépést ismert módszerekkel analóg módon, például alkilezési módszerekkel folytathatjuk le. A találmány szerinti eljárás egy előnyös foganatosítási módja szerint az alkilezést redukáló körülmények között folytatjuk le, például megfelelő aldehidet vagy ketont használva. Lefolytathatjuk például NaBH_3CN jelenlétében, előnyösen savas pH mellett, például 5 és 7 közötti pH-n. A reakcióhőmérséklet például -20°C és 100°C között lehet. Előnyös lehet a reakciót semleges oldószerben, például vízben, egy alkoholban, dioxánban vagy dimetil-formamidban vagy ezeknek az oldószereknek valamilyen elegyében lefolytatni. A D- vagy L- α -aminosav - összhangban az ismert eljárásokkal - az N-végcsoporthoz is kapcsolódhat.

A b) eljárási lépésben kiindulási anyagként használt peptid-fragmentum egy vagy több nem-természetes aminosav-egységet is tartalmazhat; N-végcsoportján és/vagy egy oldalláncban levő aminocsoportján szubsztituálva is lehet C_{2-6} alkoxi-karbonil-csoporttal vagy adott esetben szubsztituált C_{1-8} alkil-, C_{2-8} -alkenil-, C_{2-8} alkinil-, aralkil- aralkenil vagy C_{3-6} cikloalkil- C_{1-4} alkil-csoporttal. A kiindulási peptid-fragmentum az N-végcsoportján D- vagy L- α -aminosavat is hordozhat.

A természetes α -aminosav-egységeket tartalmazó, találmány szerinti vegyületek vagy azok fragmentumai rekombináns technológiával is előállíthatók.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös változatával közepes méretű polipeptid is előállítható olyan eljárással, amelyben baktériumsejtekben expresszálunk olyan fúziós

proteint, amely magában foglal egy N-terminális T4 bakteriofág 55-PTH-polipeptidet, ahol a kívánt polipeptid a bakteriofág C-terminálisához kapcsolódik.

Az 55-PTH-polipeptid a T4 bakteriofág teljes gp55 proteinjét (188 aminosav-maradék) magában foglalhatja, amelyet Gram H. és Rüger R. írtak le [The EMBO Journal 4, 257-264 (1985)]. Egy másik megoldásként a gp55 protein egy fragmentumát, előnyösen N-terminális fragmentumát lehet használni. Így például felhasználható a protein első 112 N-terminális aminosav-maradékát magában foglaló gp55 protein-frAGMENTUM. Az 55-PTH-polipeptid azonban tipikusan magában foglalja a gp55 proteinnek legalább az első 25 N-terminális aminosav-maradékát.

A közepes méretű polipeptid körülbelül 20-100, például 150, előnyösen azonban körülbelül 20 - 50 aminosav hosszúságú. A közepes méretű polipeptidek példáiként megemlíti a kalcitoninokat, az endorfinokat, a gyomor gátló peptidjét, ill. peptidjeit, a glukagont, az Y neuropeptidet, a növekedési hormont felszabadító faktort (GHRF), az amiloid- β -protein-frAGMENTUMOKAT, a hirudint, az inzulint, a szomatosztatint, az epidermális növekedési faktort, az idegnövekedési faktort és a PTH-t vagy ezeknek a frAGMENTUMAIT. A találmány szerinti eljárással előállítható közepes méretű, különösen előnyös polipeptidek az olyan találmány szerinti vegyületek vagy azok frAGMENTUMAI, amelyek természetes aminosavszubsztitúciókkal rendelkeznek.

Az 55-PTH génterméket tartalmazó fúziós protein előnyösen egy felhasználható linkert is tartalmaz az 55-PTH-polipeptid és

a kívánt polipeptid között. A hasítható linker előnyösen kémiai úton hasítható, és még előnyösebb, ha Asp-Pro-Pro vagy Asn-Gly-Pro aminosav-szekvenciákat tartalmaz.

A találmány oltalmi köre előnyösen kiterjed egy olyan nukleotid-szekvenciára is, amely egy N-terminális T4-bakteriofág 55-PTH-polipeptidet és a szekvencia C-terminálisához kapcsolódó, kívánt közepes méretű polipeptidet tartalmazó fúziós proteint kódol.

A nukleotid-szekvencia előnyösen olyan DNS-szekvencia, amely alkalmas baktériumokban való expresszállódásra. A szekvencia jellegzetesen olyan nukleotidokat tartalmaz, amelyek az 55-PTH-gén és a kívánt polipeptidet kódoló szekvenciák között egy hasítható linkert kódolnak.

A találmány olyan bakteriális expressziós vektorra is vonatkozik, amely egy a fúziós proteint kódoló DNS-szekvenciát is magában foglal.

Az expressziós vektor a fúziós proteint kódoló szekvencián kívül jellegzetesen tartalmaz még megfelelő, expressziót szabályozó szekvenciákat, ideértve egy megfelelő promótert, egy operátort és egy riboszóma-kötő helyet is, továbbá egyéb megfelelő szabályozó szekvenciákat. Rendszerint az expressziós vektor is tartalmaz egy vagy több szelektálható markert.

Bármilyen megfelelő promótert használhatunk, így a TrpE, λ P1, λ Pr, lac vagy Tac promótert. A promóter előnyösen T7 bakteriofág-promóter, míg az expressziós vektor egy plazmid. E. coli expresszállásához egy R1 vagy Col-E1 plazmidből származó vektor használható fel. Például a Novagen-től kapott

pET 17B expressziós vektor vagy hasonló expressziós vektorok használhatók fel.

A találmány fúziós proteint kódoló szekvenciával vagy egy fentebb leírt expressziós vektorral transzformált bakteriális gazdasejtekre is vonatkozik. Bármilyen megfelelő bakteriális gazdasejtet felhasználhatunk, bár előnyös az *E. coli* gazdasejt felhasználása. Így például felhasználhatók a BL21 (DE3) Lys E *E. coli* törzs és hasonló törzsek.

A fúziós protein előnyösen oldhatatlan fehérjezárványok alakjában gyülemlik fel a gazdasejtekben, és ezáltal megkönnyíti a fúziós protein terméknek a sejtekből való kinyerését. A kívánt polipeptid-terméknek a fúziós proteinből való kinyerése céljából a fehérjezárványok proteinjét stabilizáljuk, és a kívánt polipeptid-terméket lehasítjuk a fúziós proteinről. Bármilyen szolubilizáló kezelést használhatunk, ideértve a savas kezelést, például körülbelül 2-4-es pH-értéken, előnyösen savval körülbelül 2,5-ös pH-értéken végzett kezelést, vagy egy denaturálószerrel, például enyhe denaturálószerrel, így guanidin-hidrokloriddal végzett kezelést. Emellett szükség lehet egy vagy több olyan nemkívánt N-terminális aminosav-maradék eltávolítására a termékből, amely visszamaradt a hasítás után.

A találmány vonatkozik továbbá olyan eljárásra is, amelynek a segítségével egy kívánt közepes méretű polipeptidet állítunk elő bakteriális gazdasejtben. Az eljárás során fentebb meghatározott transzformált bakteriális gazdasejtekkel fúziós proteint expresszáltatunk fehérjezárványok alakjában; ezután elkülönítjük a fehérjezárványokat, majd szolubilizáljuk

azokat, és végül lehasítjuk a kívánt polipeptidet a fúziós proteinről.

Egyes közepes méretű polipeptidek, így a PTH-vegyületek esetében rendes körülmények között nincs szükség arra, hogy gondosan ellenőrzött denaturálási és renaturálási eljárást folytassunk le PTH-termékek aktív alakban való előállításához, például PTH-szerű aktivitással rendelkező termékek előállításához. A közepes méretű polipeptid-termékek aktív alakban állíthatók elő egyszerűen olyan módon, hogy a szolubilizáláshoz használt savas körülményeket semlegesítjük. A szolubilizálás és a fúziós protein lehasítása egyetlen lépésben is lefolytatható.

A találmány olyan fúziós proteinre is vonatkozik, amely N-terminális T4 bakteriofág 55-PTH-polipeptidet tartalmaz, amely annak C-terminálisához kapcsolódik; ez egy kívánt közepes méretű polipeptid.

Azt találtuk, hogy ha a találmány szerinti eljárásokat és vektorokat használjuk, a közepes méretű polipeptideket, különösen a PTH-termékeket magas szinten állíthatjuk elő. Az *E. coli*-ban azt találtuk, hogy az expresszált összes proteinnek mintegy 50%-a a kívánt fúziós protein lehet. A fúziós protein is képezhet fehérjezárványokat, amelyeket könnyű elkülöníteni a sejtek többi anyagától. Emellett a fehérjezárványok gyakran legalább 90%-ban a kívánt fúziós proteinből állnak, aminek következtében jelentős mértékben csökkenthető a szükséges tisztítás mértéke. A PTH-termék fúziós protein alakjában való expresszálása lényegesen csökkentheti a baktériumsejtben a polipeptid endogén feldolgozását, aminek következtében homo-

gén termékeket kaphatunk.

A hasítható linker egy előnyös kiviteli alakja vegyileg hasítható aminosavakat tartalmaz a kívánt polipeptid N-végcsoportja mellett, ami lehetővé teszi a kívánt polipeptidnek a fúziós proteinről való lehasítását egyszerű kémiai módszerekkel. A kívánt polipeptid előnyösen nem tartalmaz vegyileg lehasítható csoportokat.

A vegyileg hasítható linkerek előnyösen Asp-Pro-Pro vagy Asn-Gly-Pro aminosavakat tartalmaznak. Az Asp-Pro vagy az Asn-Gly kötések vegyileg lehasíthatók savas körülmények mellett, például hangyasav jelenlétében (rendes körülmények között kb. 2,5-es pH-értéknél) vagy hidroxil-amin jelenlétében. A kívánt polipeptid N-végcsoportján megmaradó Pro-Pro vagy Gly-Pro dipeptid azután megfelelő dipeptil-peptidáz használatával eltávolíthatók. Így például használhatjuk az *L. lactis* X-Pro EC 3.4.14.5 dipeptil-peptidázát. Ezt a peptidáz Nardi és munkatársai írták le [Applied and Environmental Microbiology, 57, 45-50 (1991)].

A kívánt polipeptidet a fúziós proteinről való lehasítást követően tisztíthatjuk. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás technika alkalmazható erre a célra. A tisztítást bármilyen nemkívánatos N-terminális aminosav-maradék eltávolítása előtt hajthatjuk végre.

A találmány szerinti eljárás további szemléltetésére szolgálnak a 306-312. példák, amelyek a jelen leíráshoz csatolt szekvencialistában megadott szekvenciákra utalnak. Ezekben a szekvenciákban az 1. azonosítószámú szekvencia a pET17B plazmidba klónozott, csonkolt gp55-Asp-Pro-Pro-(1-38)hPTH-OH

fúziós protein aminosavszekvenciáját és megfelelő DNS-szekvenciáját mutatja, míg a 3. azonosítószámú szekvencia a pET17B plazmidba klónozott teljes hosszúságú gp55-Asn-Gly-Pro-(1-38)hPTH-OH fúziós protein aminosav-szekvenciáját és megfelelő DNS-szekvenciáját mutatja.

Az alábbi példákban az összes hőmérsékletet °C-ban adjuk meg és az alábbi rövidítéseket használjuk:

BOC	= terc.-butil-oxi-karbonil
DMF	= dimetil-formamid
DCM	= diklór-metán
Fmoc	= 9-fluorenil-metoxi-karbonil
HOBT	= 1-hidroxi-benzotriazol
TFA	= trifluor-ecetsav
Trt	= tritil = trifenil-metil
RP-HPLC	= fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
r.t.	= szobahőmérséklet
DNP	= dinitro-fenil
Tos	= tozil
DIPC	= diizopropil-karbodiimid
Pmc	= 2,2,5,7,8-pentametil-kromán-6-szulfonil
Ip	= izopropil
For	= formil
Cpe	= 1-amino-ciklopentán-1-karbonsav
Cpp	= 1-amino-ciklopropán-1-karbonsav
Cha	= ciklohexil-alanin
tBu	= terc-butil

A 11. azonosítószámú szekvencia az (1-34)hPTH aminosav-

szekvenciáját mutatja; a 12. azonosítószámú szekvencia az (1-36)hPTH aminosav-szekvenciáját mutatja. A 13. azonosítószámú szekvencia az (1-38)hPTH aminosav-szekvenciáját mutatja. Az 1., 2., 5., 6., 11., 20-24., 27-30., 36., 37., 40., 41., 47., 49., 51., 53., 54., 57., 58., 61., 76-80., 82., 179., 185., 187., 191-193., 226., 230., 237., 239., 256. és 289. példák a 11. azonosítószámú szekvencián alapszanak, ahol a megváltozott aminosav-egységeket és azok helyzetét a szögletes zárójelekben mutatjuk. A 12., 13., 18., 19., 31-35., 38., 39., 42-46., 48., 50., 52., 55., 59., 60., 62-71., 81., 83-85., 165-178., 180-184., 186., 188-190., 194-225., 227-229., 231-236., 238., 240-255., 257-266., 268-279., 282-288., 290-300. és 302-304. példák a 12. azonosítószámú szekvencián alapszanak, ahol a megváltozott aminosav-egységeket és azok helyzetét a szögletes zárójelekben adjuk meg. A 3., 4., 7-10., 14-17., 25., 26., 56., 72-75., 81., 86-164., 267., 280. és 281. példák a 13. azonosítószámú szekvencián alapszanak, ahol a megváltozott aminosav-egységeket és azok helyzetét a szögletes zárójelekben adjuk meg.

1. példa

N^{α} -Izopropil-(1-34)hPTH-NH₂

Ezt a peptidet polisztirolgyanta alapú hordozón lépésenként építjük fel. A Boc-csoportot az α -aminosav-csoport védelésére használjuk, és az oldalláncban levő funkciós csoportokat a következő módokon védjük: Lys(2-klór-benzil-oxi-karbonil), Ser(benzil), Thr(benzil), Glu(benzil), Asp(benzil), Met(O), His(DNP), Arg(Tos) és Trp(HCO). A többi csoportot nem

védjük.

Amino-4-metil-fenil-metil-ko(polistírol-divinil-benzol = MBHA-gyanta) kiindulási anyagot 0,7 mmol/g mennyiségben az alábbi, (1)-től (7)-ig terjedő lépésekben ciklusos kezelésnek vetünk alá:

- (1) DCM
- (2) 50%-os trifluor-ecetsav DCM-ben
- (3) DCM
- (4) 10%-os diizopropil-etil-amin DMF-ben
- (5) DMF
- (6) Boc-aminosav preformált szimmetrikus anhidridje
(1,4 mmol per 1 g kiindulási gyanta) DMF-ben
- (7) DMF

A mosófolyadékok és a reagensek térfogata 1 gramm kiindulási gyantára számítva 5-20 ml. Minden egyes lépést annyiszor ismételünk meg, ahányszor ez szükséges vagy a gyanta reakciójának teljessé tételéhez (2., 4. és 6. lépés) vagy az előző reagensnek a gyantáról való teljes eltávolításához (1., 3., 5. és 7. lépés). Minden egyes ciklus után gyantamintát veszünk és azt ellenőrizzük a kapcsolási reakció teljességére kolorimetriás próbával, ninhidrint használva a megmaradó aminocsoportok kimutatására.

A Boc-aminosavak szimmetrikus anhidridjeit közvetlenül felhasználás előtt állítjuk elő olyan módon, hogy 1 g gyantára számítva 2,8 mmol Boc-aminosavat és 1,4 mmol DCCI-t reagáltatunk olyan diklór-metánban, amely DMF-et a Boc-aminosav teljes oldódásához elegendő mennyiségben tartalmaz. Az elegyet szűrjük, további dimetil-formamidot adunk a szűrlethez,

amelyet illékony komponensek lehajtásával 15 °C-ot meg nem haladó hőmérsékleten betöményítünk, majd a kapott oldatot a (6) lépésben használjuk fel.

Az (1)-(7) reakciókból álló ciklust minden egyes aminosav-maradékkal kapcsolatban megismételjük úgy, hogy a címben megadott vegyület szekvenciáját kapjuk, kivéve a Boc-Gln-OH és a Boc-Arg(Tos)-OH csoportokat, amelyeket dimetil-formamidban előformált 1-hidroxibenzotriazol-észtereikként kapcsolunk a (6) lépésben.

A teljesen összeállított peptidgyantát kétszer kezeljük szobahőmérsékleten 20 ml 5% tiofenolt tartalmazó dimetil-formamiddal 1 órán keresztül, majd dimetil-formamiddal, metanollal és diklór-metánnal mossuk. A peptidgyantát ismét alávetjük az (1)-(5) lépéseknek, ami után 1 g gyantára számítva 0,5 ml acetont, 84 mg nátrium-ciano-bór-hidridet és 0,2 ml ecetsavat adunk hozzá 20 ml dimetil-formamidban. A gyantát 16 órán át szobahőmérsékleten tartjuk, majd dimetil-formamiddal és diklór-metánnal mossuk, végül megszárítjuk.

A peptidgyantát folyékony hidrogén-fluoriddal, dimetilszulfiddal, p-krezollal és etán-1,2-ditiollal kezeljük "low-high" eljárással, amelyet például az International Journal of Peptide and Protein Research-ben írtak le [26, 262-273 (1985)]. Az illékony komponensek eltávolítása és etil-acetáttal való mosás után a maradékot többször mossuk 1%-os etil-acetáttal, majd szűrjük és a szűrletet liofilizáljuk. A liofilizált terméket fordított fázisú kromatográfiával többször tisztítjuk; a kromatografálást oktadecil-szilícium-dioxid oszlopon végezzük, 2%-os foszforsavban vagy 20 mM-os tetra-

metil-ammónium-foszfátban acetonitril-gradienst használva. A tiszta vegyületet tartalmazó frakciókat egyesítjük, gyengén bázikus, acetát-formájú ioncserélő gyantán szűrjük és a szűrletet liofilizáljuk. Így a cím szerinti vegyülethez jutunk.

MS (ionpermet): 4160.

2. példa

[Lys (N^ε-Izopropil)^{26,27}](1-34)hPTH-NH₂

A peptidet az 1. példában ismertetett módon állítjuk össze, azonban a 13-as helyzethez Lys(Fmoc)-t és az 1-es véghelyzetben Fmoc-Ser(tBu)-t használunk.

A teljesen összeállított peptidgyantát kétszer kezeljük 20 ml 5% tiofenolt tartalmazó dimetil-formamiddal szobahőmérsékleten 1 órán át, majd dimetil-formamiddal, metanollal és diklór-metánnal mossuk. A száraz gyantát folyékony hidrogén-fluoriddal kezeljük az 1. példában ismertetett módon. A lehasítás után kapott 350 mg terméket 5 ml metanol, 5 ml 5,0 pH-jú foszfát-puffer, 48 mg nátrium-ciano-bór-hidrid és 0,28 ml aceton elegyében szuszpendáljuk. Az elegyet 16 órán át szobahőmérsékleten tartjuk, majd szűrjük, és a szűrletet bepárooljuk. A maradékot 20% piperidint tartalmazó dimetil-formamidban 15 perc alatt szuszpendáljuk, majd hússzoros térfogatú dietil-éterrel hígítjuk és leszűrjük. A maradékot 100 ml vízben oldjuk, majd ecetsvat adunk hozzá mindaddig, amíg el nem érjük a 3-as pH-értéket. Ezután az elegyet szűrjük és a szűrletet liofilizáljuk. A liofilizátumot fordított fázisú kromatográfiával tisztítjuk. A kromatografálást

oktadecil-szilícium-dioxid oszlopon végezzük, 2%-os foszfor-savban acetonitril-gradienst használva. A tiszta vegyületet tartalmazó frakciókat egyesítjük, gyengén bázikus, acetát-alakú ioncserélő oszlopon szűrjük és a szűrletet liofilizáljuk. Így a cím szerinti vegyülethez jutunk.

MS (ionpermet): 4205,6.

3. példa

N^α-Izopropil [Lys (N^ε-izopropil)^{13,26,27}](1-38)hPTH-OH

a) Szilárd fázisú peptidszintézis

A peptidet lépésenként szintetizáljuk polisztirol alapú gyantahordozón. Az α-aminocsoportot Fmoc-val védjük, míg az oldalláncban levő funkciós csoportokat az alábbiak szerint védjük: Asp(OtBu), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Asn(Trt), Gln(Trt), Arg(Pmc) és Ser(tBu). A többi aminosavat nem védjük.

A lépésenkénti szilárd fázisú szintézishez 0,5 mmol/g mennyiségben 4-hidroximetil-fenoximetil-ko(polistirol-1% divinilbenzol)-lá észterezett Fmoc-Gly-t használunk kiindulási anyagként. A szintézist úgy hajtjuk végre, hogy ismételten elvégezzük az α-amino-védőcsoport eltávolításából, mosásból, az új aminosav kapcsolásából és mosásból álló ciklust. Az Fmoc-aminosavak háromszoros-ötszörös feleslegét kapcsoljuk előformált HOBt-észterekként, diizopropil-karbodiimidet használva. Fmoc-Arg(Pmc)-t, Fmoc-Asn(Trt)-t és Fmoc-Gln(Trt)-t kapcsolunk szimmetrikus anhidridekként, diizopropil-karbodiimidet használva. A peptidlánc teljes összeállítása után a Ser¹ Fmoc védőcsoportját 20% piperidint tartalmazó dimetil-

formamiddal távolítjuk el. A peptidnek a polisztirolgyantáról való lehasítását és az összes oldalláncbeli védőcsoport eltávolítását olyan módon végezzük, hogy a peptidgyantát három órán át kezeljük szobahőmérsékleten 10% etán-ditíol, tioanizol, tio-krezol és víz, valamint 90% trifluor-ecetsav elegyével. A gyantarészecskéket leszűrjük és kevés trifluor-ecetsavval mossuk. A terméket az egyesített szűrletekből etiléter hozzáadásával kicsapjuk, majd szűrjük és szárítjuk. A terméket C-18 szilícium-dioxid oszlopon kromatografáljuk, 2% foszforsavat tartalmazó vízben acetonitril-gradienst használva. A tiszta vegyületet tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, anioncserélő gyantán (Biorad, AG 4-X4, 100-200 lyukbősségű acetát-forma) szűrjük és liofilizáljuk. Ilyen módon (1-38)hPTH-OH terméket kapunk.

b) Alkilezés

40 mg (9 μ mol) (1-38)hPTH-OH kiindulási anyagot (ami 4458,2 g/mol mennyiségnek felel meg) oldunk 1,2 ml metanolban, 1,2 ml foszfát-pufferben (Merck No. 9887, 5,0 pH-ra beállítva), 45 mg (716 mmol) NaBH_3CN -ben (62,84 g/mol) és 0,8 ml (11 mmol) acetonban (73,52 ml/mol). A reakciót C-18 szilícium-dioxid-oszlopon fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával ellenőrizzük és 15 óra eltelte után szobahőmérsékleten fejezzük be. A reakcióelegyet vízzel hígítjuk és C-18 szilícium-dioxid-oszlopon kromatografáljuk, 2% foszforsavat tartalmazó vízben acetonitril-gradienst használva. A tiszta terméket tartalmazó frakciókat összegyűjtjük, anioncserélő gyantán (acetát-alak) szűrjük és liofilizáljuk. Így poliacetát, polihidrát alakban kapjuk a cím szerinti

vegyületet.

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

MS (ionpermet): 4626.

4. példa

N^α-Metil [Ala¹](1-38)PTH-OH

A peptidláncot a 3.a) példában ismertetett módon állítjuk össze, azonban az 1-es helyzetben Fmoc-Ser(tBu)-OH helyett az Fmoc-N^α-metil-Ala-OH nem-természetes aminosavat kapcsoljuk a peptidgyantához. A hasítást, a védőcsoportok eltávolítását és a tisztítást a 3.a) példa szerinti módon végezzük.

MS (ionpermet) = 4455,91.

5. példa

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

Ezt a peptidet a 3.a) példa szerinti eljárással állítjuk elő, azonban 4-hidroximetil-fenoximetil-ko(polistírol-divinil-benzol)-lá észterezett Fmoc-Gly helyett a megfelelő Fmoc-aminosavat, például Fmoc-Ala-t, Fmoc-Phe-t, Fmoc-D-Ala-t, Fmoc-D-Phe-t stb.-t használunk. Ezenkívül az oldalláncban levő funkciós csoportokat a következőképpen védjük: Thr(terc-butyl), Trp(Boc) és (Tyr(terc-butyl)).

A 3. és az 5. példákban ismertetett eljárást ismételve, de a megfelelő kiindulási anyagokat használva az alábbi vegyületek állíthatók elő.

6. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³]hPTH(1-34)OH
7. példa: [Ile¹]hPTH(1-38)OH (IS-MS: 4484)
8. példa: [Ala¹, Abu²]hPTH(1-38)OH (IS-MS: 4428)
9. példa: [Ala¹, Nva²]hPTH(1-38)OH (IS-MS: 4442)
10. példa: [Ala¹, Ile²]hPTH(1-38)OH (IS-MS: 4456)
11. példa: [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, His²⁶, Leu²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
12. példa: [N-MeAla¹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4286)
13. példa: [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4235)
14. példa: [Thr¹]-hPTH-(1-38)OH (IS-MS: 4472)
15. példa: [Leu¹]-hPTH-(1-38)OH (IS-MS: 4484)
16. példa: [Abu¹]-hPTH-(1-38)OH (IS-MS: 4456)
17. példa: [Gaba¹]-hPTH-(1-38)OH (IS-MS: 4456)
18. példa: [Leu⁸, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH
19. példa: [Leu⁸, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Arg²²]hPTH(1-36)OH
(IS-MS: 4347)
20. példa: [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]-hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4007)
21. példa: [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
(IS-MS: 3906)
22. példa: [Leu⁸, Ala¹³, Gln¹⁸, Gln²⁶, Phe²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
23. példa: Ip-[Leu⁸, Lys(Ip)¹³, Gln¹⁸, Lys(Ip)^{26, 27}, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4175)
24. példa: Ip-[Leu⁸, Ala¹³, Gln¹⁸, Gln²⁶, Phe²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
25. példa: [Gln¹⁶]hPTH(1-38)OH
26. példa: [Ser¹⁴]hPTH(1-38)OH
27. példa: [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, His²⁵, His²⁶, Leu²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
28. példa: [Ala¹, Ala³, Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Gln²⁶, Phe²⁷, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
29. példa: [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
(IS-MS: 3965)
30. példa: [Leu⁸, Gln¹⁸, Ala²⁹, Glu³⁰, Ile³¹]hPTH(1-34)OH
31. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH

32. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ser¹⁴, Ile¹⁵, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹]hPTH(1-36)OH
33. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Leu¹⁸]hPTH(1-36)OH
34. példa: [Leu⁸, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹]hPTH(1-36)OH
35. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁷, Leu¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4252)
36. példa: [Leu⁸, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
37. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4022)
38. példa: [Leu⁸, Ala¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
39. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Ala¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
40. példa: [Leu⁸, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
41. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 4077)
42. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4181)
43. példa: [Leu⁸, Ala¹⁶, Asp¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4193)
44. példa: [Leu⁸, Ala¹⁶, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4149)
45. példa: [Leu⁸, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
46. példa: [Leu⁸, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²²]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4219)
47. példa: [Leu⁸, Ala¹⁷, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3960)
48. példa: [Leu⁸, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH
49. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3980)
50. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4240)
51. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3923)
52. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4225)
53. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³]hPTH(1-34)OH (IS-MS: 3999)

54. példa: [Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, His²⁶, Leu²⁷, Thr³³]
hPTH(1-34)OH
55. példa: [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²²]hPTH(1-36)OH
56. példa: [Ile¹⁵]hPTH(1-38)OH
57. példa: [Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²², His²⁶, Leu²⁷,
Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
58. példa: [Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Arg¹⁹, His²⁶, Leu²⁷, Thr³³,
Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
59. példa: [Leu⁸, Ser¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²²]hPTH(1-36)OH
60. példa: [Leu⁸, Ala¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²⁶, Arg²⁷]
hPTH(1-36)OH
61. példa: [Leu⁸, Gln¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, His²⁶, Leu²⁷, Arg³³,
Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
62. példa: [Leu⁸, Ala^{16, 17, 18, 19}]hPTH(1-36)OH
63. példa: [Leu⁸, Ala¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Gln²⁶, Phe²⁷]
hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4127)
64. példa: Ip-[Leu⁸, Ala¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Gln²⁶, Phe²⁷]
hPTH(1-36)OH
65. példa: Ip-[Leu⁸, Lys (Ip)¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹,
Lys (Ip)^{26, 27}]hPTH(1-36)OH
66. példa: [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4166)
Ip-[Leu⁸, Lys (Ip)¹³, Ala¹⁶, Ala¹⁷, Ala¹⁸, Ala¹⁹,
67. példa: Lys (Ip)^{26, 27}]hPTH(1-36)OH
68. példa: [Aib³, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4283)
69. példa: Ip-[Leu⁸, Asp¹⁰, Lys (Ip)^{11, 13, 26, 27}, Gln¹⁸]
hPTH(1-36)OH
70. példa: Ip-[Leu⁸, Ser¹³, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg²²,
Lys (Ip)^{26, 27}]hPTH(1-36)OH
71. példa: [Leu⁸, Tyr¹⁸]hPTH(1-36)OH
72. példa: [Ser³³]-hPTH-(1-38)-OH
73. példa: [Thr³³]-hPTH-(1-38)-OH
74. példa: [Leu³³]-hPTH-(1-38)-OH
75. példa: [Gly³³]-hPTH-(1-38)-OH
76. példa: [Leu⁸, His¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH

77. példa: [Leu⁸, Gly¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
78. példa: [Leu⁸, Glu¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
79. példa: [Leu⁸, Thr¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
80. példa: [Leu⁸, Gln¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
81. példa: [Gln³³]-hPTH-(1-38)-OH
82. példa: [Leu⁸, Tyr¹⁰, Gln¹⁸, Arg²², Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)OH
83. példa: [1-amino-ciklopentán-1-karbonsav¹, Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH(1-36)OH
84. példa: [1-amino-ciklopentán-1-karbonsav¹, Leu⁸, Ala^{13,16}, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Arg^{26,27}]hPTH(1-36)OH
85. példa: [1-amino-ciklopentán-1-karbonsav³, Gln¹⁸]hPTH(1-36)OH (IS-MS: 4309)
86. példa: [Arg¹²]-hPTH-(1-38)-OH
87. példa: [Ser¹²]-hPTH-(1-38)-OH
88. példa: [Cys¹³]-hPTH-(1-38)-OH
89. példa: [Ile¹³]-hPTH-(1-38)-OH
90. példa: [Asn¹³]-hPTH-(1-38)-OH
91. példa: [Trp¹³]-hPTH-(1-38)-OH
92. példa: [Asp¹³]-hPTH-(1-38)-OH
93. példa: [Val¹³]-hPTH-(1-38)-OH
94. példa: [Thr¹³]-hPTH-(1-38)-OH
95. példa: [Ser¹³]-hPTH-(1-38)-OH
96. példa: [Tyr¹³]-hPTH-(1-38)-OH
97. példa: [Met¹³]-hPTH-(1-38)-OH
98. példa: [Gln¹³]-hPTH-(1-38)-OH
99. példa: [Leu¹³]-hPTH-(1-38)-OH
100. példa: [Ala¹³]-hPTH-(1-38)-OH
101. példa: [Gly¹³]-hPTH-(1-38)-OH
102. példa: [Val¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
103. példa: [Ala¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
104. példa: [Lys¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
105. példa: [Arg¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
106. példa: [Thr¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
107. példa: [Ile¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH

108. példa: [Tyr¹⁴]-hPTH-(1-38)-OH
109. példa: [Tyr¹⁵]-hPTH-(1-38)-OH
110. példa: [Arg¹⁵]-hPTH-(1-38)-OH
111. példa: [Val¹⁵]-hPTH-(1-38)-OH
112. példa: [Lys¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
113. példa: [Ser¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
114. példa: [Leu¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
115. példa: [Ala¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
116. példa: [Gly¹⁶]-hPTH-(1-38)-OH
117. példa: [Ala¹⁷]-hPTH-(1-38)-OH
118. példa: [Met¹⁷]-hPTH-(1-38)-OH
119. példa: [Ile¹⁷]-hPTH-(1-38)-OH
120. példa: [Ser¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
121. példa: [Lys¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
122. példa: [Leu¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
123. példa: [Ala¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
124. példa: [Tyr¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
125. példa: [Met¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
126. példa: [His¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
127. példa: [Val¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
128. példa: [Gly¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
129. példa: [Pro¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
130. példa: [Asp¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
131. példa: [Ile¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
132. példa: [Val¹⁹, Gln²⁴]-hPTH-(1-38)-OH
133. példa: [Arg¹⁹]-hPTH-(1-38)-OH
134. példa: [Phe²⁰]-hPTH-(1-38)-OH
135. példa: [Ala²¹]-hPTH-(1-38)-OH
136. példa: [Gly²¹]-hPTH-(1-38)-OH
137. példa: [Phe²¹]-hPTH-(1-38)-OH
138. példa: [Leu²¹]-hPTH-(1-38)-OH
139. példa: [Asn²¹]-hPTH-(1-38)-OH
140. példa: [Gln²¹]-hPTH-(1-38)-OH
141. példa: [Ser²¹]-hPTH-(1-38)-OH

142. példa: [Gly²²]-hPTH-(1-38)-OH
 143. példa: [Leu²²]-hPTH-(1-38)-OH
 144. példa: [His²²]-hPTH-(1-38)-OH
 145. példa: [Ala²²]-hPTH-(1-38)-OH
 146. példa: [Ile²²]-hPTH-(1-38)-OH
 147. példa: [Val²²]-hPTH-(1-38)-OH
 148. példa: [Ser²²]-hPTH-(1-38)-OH
 149. példa: [Arg²²]-hPTH-(1-38)-OH
 150. példa: [Arg²⁶]-hPTH-(1-38)-OH
 151. példa: [Val²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
 152. példa: [Ile²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
 153. példa: [Leu²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
 154. példa: [Arg²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
 155. példa: [Ala²⁷]-hPTH-(1-38)-OH
 156. példa: [Val²⁸]-hPTH-(1-38)-OH
 157. példa: [Ile²⁸]-hPTH-(1-38)-OH
 158. példa: [Pro³, Thr³³]-hPTH-(1-38)-OH
 159. példa: [Arg³³]-hPTH-(1-38)-OH
 160. példa: [Pro³³]-hPTH-(1-38)-OH
 161. példa: [Asp³³]-hPTH-(1-38)-OH
 162. példa: [Ile³³]-hPTH-(1-38)-OH
 163. példa: [Lys³³]-hPTH-(1-38)-OH
 164. példa: [Ile³¹, Arg³³]-hPTH-(1-38)-OH

165. példa

[1-Amino-ciklopentán-1-karbonsav¹]- (1-36)hPTH-NH₂

A peptidet lépésenként állítjuk össze polistírol-alapú gyantahordozón. Az Fmoc csoportot használjuk az α-aminocsoportok védésére.

Az oldalláncban levő funkciós csoportokat az alábbi formában védjük: Arg(Pmc), Asn(Trt), Asp(OtBu), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc) és Tyr(tBu). A többi aminosavat nem védjük.

0,4 mmol/g 4-(2',4'-dimetoxi-fenil-Fmoc-amino-metil)-fe-

noxi-ko(polistírol-divinil-benzol)-t - amelyet például a Tetrahedron Letters-ben [28, 3787-3790 (1987)] ismertetett módon állíthatunk elő - az (1)-(5) lépésekből álló ciklusos kezelésnek vetünk alá:

- (1) DMF
- (2) 20%-os piperidin dimetil-formamidban
- (3) DMF
- (4) HOBT, diizopropil-karbodiimid és Fmoc-alanin
elegye (mindegyikből a kiindulási gyanta 1 g-jára vonatkoztatva 0,8 mmol)
- (5) DMF

A mosófolyadékok és a reagensek térfogata 5-20 ml a kiindulási gyanta 1 g-jára számítva.

Az (1)-(5) lépésekből álló következő kezelési ciklusban az Fmoc-alanint Fmoc-valinnal helyettesítjük, és ugyanezt a keveréket használjuk a további ciklusokban is mindaddig, amíg a gyantán a cím szerinti vegyületnek megfelelő helyes aminosav-szekvenciát nem kapjuk.

Mindegyik lépést annyiszor ismételjük meg, ahányszor ez szükséges ahhoz, hogy a gyantán teljessé tegyünk a reakciót (2. és 4. lépés) vagy teljessé tegyünk a gyantáról az előző reagens(ek) eltávolítását. Az egyes ciklusok után gyantamin-tákat veszünk és azokkal ellenőrizzük a kapcsolási reakció teljességét, kolorimetriás próbát használva ninhidrinnel a maradék aminocsoportok kimutatására.

A szintézis végén csak az (1)-(3) lépésekből álló ciklust hajtjuk végre, és a peptidgyantát 2-propanollal, majd metanol és metilén-klorid 1:1 térfogatarányú elegyével mossuk,

végül vákuum-deszikkátorban alaposan megszárítjuk .

1 g peptidgyantát szuszpendálunk trifluor-ecetsav, víz és 1,2-etán-ditiol 90:5:5 térfogatarányú elegyének 20 ml-jében 2 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd a gyantarészeket szűrjük és kevés trifluor-ecetsavval mossuk. A terméket az egyesített szűrletből hússzoros térfogatú dietil-éter hozzáadásával kicsapjuk, majd szűrjük, éterrel mossuk és szárítjuk. A maradékot 2%-os ecetsavban oldjuk és az oldatot szobahőmérsékleten 8 órán át állni hagyjuk, majd liofilizáljuk. A liofilizátumot C-18 szilícium-dioxid-oszlopon kromatografáljuk, 2%-os foszforsavban acetonitril-gradienst használva. A frakciókat analitikai nagyteljesítményű folyadékkromatográfiával ellenőrizzük, és a tiszta vegyületet tartalmazó részeket összegyűjtjük, acetát-formájú anioncserélő gyantán keresztül szűrjük és liofilizáljuk. Így poliacetát, polihidrát alakjában kapjuk a cím szerinti vegyületet.

A peptidgyanta közbenső termékének előállításához használt Fmoc-1-amino-ciklopentán-1-karbonsavat például a G. Valle és munkatársai által leírt módon állíthatjuk elő [Can. J. Chem. **66**, 2575-2582 (1988)].

MS (ionpermet): 4312.

166. példa

[1-(1-Amino-ciklopropán-1-karbonsav)]-(1-36)hPTH-NH₂

Ezt a peptidet a 165. példában ismertetett módon állítjuk elő. A peptidgyanta közbenső termék előállítása során használt Fmoc-1-amino-ciklopropán-1-karbonsavat például az M. Crisma és munkatársai által ismertetett módon [Int. J. Biol.

Macromol. 11, 345-352 (1989)] állíthatjuk elő.

MS (ionpermet): 4283.

A 165. példában ismertetett eljárás megismétlésével, de a megfelelő kiindulási anyagok felhasználásával az alábbi vegyületeket állíthatjuk elő:

167. példa: [D-Pro¹]hPTH(1-36)NH₂
168. példa: [Nva¹]hPTH(1-36)NH₂
169. példa: [N-Me-Ser¹]hPTH(1-36)NH₂
170. példa: [Indol-2-karbonsav¹]hPTH(1-36)NH₂
171. példa: [Indol-3-karbonsav¹]hPTH(1-36)NH₂
172. példa: [Piridin-3-karbonsav¹]hPTH(1-36)NH₂
173. példa: [Piridin-2-karbonsav¹]hPTH(1-36)NH₂
174. példa: [Hexahidropiridazin-3-karbonsav¹]
hPTH(1-36)NH₂
175. példa: [Morfolin-2-karbonsav¹]hPTH(1-36)NH₂
176. példa: [Pro¹]hPTH(1-36)NH₂
177. példa: [Leu¹]hPTH(1-36)NH₂
178. példa: [Ile¹]hPTH(1-36)NH₂
179. példa: [Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)NH₂
180. példa: [Nva⁸]hPTH(1-36)NH₂
181. példa: [Gln¹⁸]hPTH(1-36)NH₂
182. példa: [Tyr¹⁸]hPTH(1-36)NH₂
183. példa: [Lys¹⁸]hPTH(1-36)NH₂
184. példa: [Ala¹⁸]hPTH(1-36)NH₂
185. példa: [Phe²³, His²⁵, His²⁶, Leu²⁷]-hPTH(1-34)NH₂
186. példa: [Phe²³]-hPTH(1-36)NH₂ (IS-MS: 4247)
187. példa: [Phe²³, His²⁵, His²⁶, Leu²⁷, Ile²⁸, Ala²⁹, Glu³⁰, Ile³¹,
Thr³³, Ala³⁴]-hPTH(1-34)NH₂ (IS-MS: 3934)
188. példa: [Ala²⁹]-hPTH(1-36)NH₂ (IS-MS: 4248)
189. példa: [Ala³⁴]-hPTH(1-36)NH₂ (IS-MS: 4210)
190. példa: [Gln²⁵]hPTH(1-36)NH₂
191. példa: [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH(1-34)NH₂
192. példa: [Ala¹, His⁵, Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Thr³³, Ala³⁴]
hPTH(1-34)NH₂

193. példa: [Ser¹⁴, Ile¹⁵, Gln¹⁶, Asp¹⁷, Leu¹⁸, Arg¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]
hPTH(1-34)NH₂
194. példa: [D-Phe³⁴, D-Ala³⁶]hPTH(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4290]
195. példa: [Ala³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4271]
196. példa: [D-Ser³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4290]
197. példa: [D-Glu⁴]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4290]
198. példa: [D-His⁹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4286]
199. példa: [Ala¹⁰]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4243]
200. példa: [D-Asn¹⁰]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
201. példa: [Ala¹²]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4299]
202. példa: [Gln¹³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4287]
203. példa: [His¹³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4296]
204. példa: [Leu¹³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4371]
205. példa: [Ala¹³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4228]
206. példa: [Ala¹³, Gln²⁶, Phe²⁷, D-Phe³⁴, D-Ala³⁶]hPTH(1-36)NH₂
[MS(IS): 4249]
207. példa: [Ala¹⁴]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4219]
208. példa: [D-His¹⁴]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
209. példa: [D-Asn¹⁶]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4284]
210. példa: [Ala¹⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4270]
211. példa: [D-Ser¹⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
212. példa: [Ala¹⁹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4228]
213. példa: [D-Glu¹⁹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
214. példa: [Ala²¹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4257]
215. példa: [Ala²²]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4227]
216. példa: [Gln²⁶]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4287]
217. példa: [Nle²⁶]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4271]
218. példa: [D-Lys²⁶]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
219. példa: [Nle^{8, 18, 27}]hPTH(1-36)NH₂
220. példa: [His²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4294]
221. példa: [Phe²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4304]
222. példa: [Nle²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4271]
223. példa: [Asn²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4271]
224. példa: [Ala²⁷]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4228]
225. példa: [D-Gln²⁹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4289]
226. példa: [D-Asp³⁰]hPTH(1-34)NH₂ [MS(IS): 4118]

227. példa: [Ala³⁰]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4241]
 228. példa: [D-Val³¹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4290]
 229. példa: [Ala³¹]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4258]
 230. példa: [Lys³²]hPTH(1-34)NH₂ [MS(IS): 3832]
 231. példa: [D-His³²]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
 232. példa: [Ala³²]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4219]
 233. példa: [D-Asn³³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4288]
 234. példa: [Ala³³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4210]
 235. példa: [NMePhe³⁴]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4301]
 236. példa: [D-Asp³⁰]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4290]
 237. példa: Ip-[Nle^{8,18}, Lys(Ip)^{13,26,27}, D-Asn³³, D-Phe³⁴]
 hPTH(1-34)NH₂
 238. példa: Ip-[Nle^{8,18,27}, Lys(Ip)^{13,26}]hPTH(1-36)NH₂
 239. példa: [Nle^{8,18}, D-Asn³³, D-Phe³⁴]hPTH(1-34)NH₂
 [MS(IS): 4080]
 240. példa: [Lys(Ip)¹³]hPTH(1-36)NH₂ [MS(IS): 4331]
 241. példa: Propargil-[Al¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 242. példa: [Ala⁰]-hPTH-(1-36)-NH₂
 243. példa: [Pro⁰]-hPTH-(1-36)-NH₂
 244. példa: Acetyl-hPTH-(1-36)-NH₂
 245. példa: [HyPro¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 246. példa: N-Dimetil-[Ala¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 247. példa: [D-Ser¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
 248. példa: [Lys(For)¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4356]
 249. példa: [D-glicerinsav¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 250. példa: [Asn¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 251. példa: [4-Aminobenzoésav¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 252. példa: [4-Aminoszalícilsav¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 253. példa: [TMSA¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4343]
 254. példa: [Phe¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 255. példa: [Propargilglicin¹]-hPTH-(1-36)-NH₂
 256. példa: [Ala¹, His⁵, Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Phe²², Phe²³, His²⁵, His²⁶,
 Leu²⁷, Thr³³, Ala³⁴]-hPTH-(1-34)-NH₂
 257. példa: [Abu²]-hPTH-(1-36)-NH₂
 258. példa: [D-Val²]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS(IS): 4288]
 259. példa: [terc-Leu²]-hPTH-(1-36)-NH₂
 250. példa: [Ala²]-hPTH-(1-36)-NH₂

261. példa: [D-Ile⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 262. példa: [D-Gln⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 263. példa: [D-Leu⁷]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 264. példa: [Nle⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4268]
 265. példa: [Phe⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4303]
 266. példa: [Cha⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4309]
 267. példa: [Leu⁸]-hPTH-(1-38)-NH₂
 268. példa: [D-Leu¹¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4287]
 269. példa: [Ala¹¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4244]
 270. példa: [D-Lys¹³]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 271. példa: [D-Leu¹⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 272. példa: [Ala¹⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4243]
 273. példa: [Ala¹⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4243]
 274. példa: [Met (O₂)¹⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4320]
 275. példa: [Nle¹⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4268]
 276. példa: [D-Met¹⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 277. példa: [Lys²⁰]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4259]
 278. példa: [D-Arg²⁰]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 279. példa: [D-Val²¹]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 280. példa: [Trp (SO₂Pmc)²³]-hPTH-(1-38)-NH₂ [MS (IS): 4723]
 281. példa: [Trp (Pmc)²³]-hPTH-(1-38)-NH₂ [MS (IS): 4660]
 282. példa: [D-Trp²³]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 283. példa: [Ala²³]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4171]
 284. példa: [D-Leu²⁴]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 285. példa: [Phe²⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4277]
 286. példa: [Lys²⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4258]
 287. példa: [Ala²⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4201]
 288. példa: [Ala²⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4229]
 289. példa: [Lys^{26/27} (For)]-hPTH-(1-34)-NH₂
 290. példa: [D-Lys²⁷]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 291. példa: [D-Leu²⁸]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 292. példa: [D-Phe³⁴]-hPTH-(1-36)-NH₂ [MS (IS): 4288]
 293. példa: [D-Val³⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂
 294. példa: [Ala³⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂

295. példa: [Pro³⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂
 296. példa: [NMeVal³⁵]-hPTH-(1-36)-NH₂
 297. példa: [Thr³⁵,Ala³⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂
 298. példa: [D-Ala³⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂
 299. példa: [NMeAla³⁶]-hPTH-(1-36)-NH₂

300. példa

(5-Amino-4-fluor-2-izopropil)-hex-3-enoil-(3-36)hPTH-
 -NH₂

a) A (3-36)hPTH-NH-gyanta előállítás

Ezt a közbelső terméket a 165. példában ismertetett módon állítjuk elő.

b) [(5-Amino-4-fluor-2-izopropil)-hex-3-enoil](3-36)hPTH-
 -amid előállítás

A fentebbi a) lépésben kapott 204,6 mg Fmoc-(3-36)hPTH-NH-gyantát 5 percen át dimetil-formamiddal kezelünk, majd többször mossuk izopropanollal és dimetil-formamiddal. Az Fmoc-védő csoportot dimetil-formamid és piperidin 8:2 térfogatarányú elegyével 10 percen át végzett kezeléssel távolítjuk el. A védőcsoport nélküli PTH-fragmentumot 80 percen át 0,7 ml dimetil-formamidban rázzuk 38,1 mg 4-fluor-2-izopropil-5-terc-butoxi-karbonil-amino-hex-3-énsavval, 68,7 mg benzotriazol-1-il-oxi-trisz(pirrolidino)-foszfónium-hexafluor-foszfáttal (PyBOP) és 26,6 mg 4-metil-morfolinnal együtt. Izopropanollal és dimetil-formamiddal végzett többszöri mosás után a szilárd maradékot 55 percen át kezeljük 4,5 ml tri-fluor-ecetsav, 0,25 ml víz és 0,25 ml etán-ditiol elegyével.

Az így kapott reakcióelegyet azután szűrjük, majd dietil-éter hozzáadásával a cím szerinti vegyületet kicsapjuk a megmaradó oldatból. A terméket preparatív nagyteljesítményű folyadék-kromatográfiával tisztítjuk, Vydac-oszlopot használva; az **A** gradienst vízzel, a **B** gradienst acetonitril, víz és foszfor-sav 7:3:0,2 térfogatarányú elegyével eluáljuk.

MS (ionpermet): 4272.

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -66,8^\circ$ (c = 0,25 95%-os ecetsavban).

301. példa

4-Fluor-2-izopropil-5-terc-butoxi-karbonil-amino-
-hex-3-enoát

a) (S)-3-[1-Oxo-(4-fluor-3-hidroxi-2-izopropil)-hex-4-enil]-4-fenil-metil-2-oxazolidinon

A cím szerinti vegyületet olyan módon állítjuk elő, ahogyan ezt D. A. Evans és munkatársai írták le (Org. Synth. **68**, 1990), (S)-3-(1-oxo-izobutil)-4-fenil-metil-2-oxazolidinonból és 2-fluor-but-2-enálból kiindulva.

MS (FAB): MH^+ 350.

b) (S)-3-[1-Oxo(4-fluor-3-oxo-(2,2,2-triklór-etán-imino)-2-izopropil]-hex-4-enil)-4-fenil-metil-2-oxazolidinon

A 301.a) példa szerinti vegyületből 1,5 g-ot oldunk 6 ml diklór-metánban, majd 0 °C hőmérsékleten hozzáadunk 0,0958 ml 1,8-diaza-biciklo(5,4,0)undec-7-én-t (DBU). Ehhez az oldathoz cseppenként hozzáadunk 0 °C hőmérsékleten 0,475 ml triklór-acetonitrilt 2 ml diklór-metánban. Egy óra eltelte után a reakcióelegyet bepároljuk és a maradékot szilikagélen oszlop-

kromatográfiával tisztítjuk, oldószerként hexán és dietiléter 2:1 térfogatarányú elegyét használva.

MS (FAB): MH^+ 493.

c) (S)-3-[1-Oxo(4-fluor-5-N-2,2,2-triklór-acetil-amino-2-izopropil)-hex-3-enil]-4-fenil-metil-2-oxazolidinon

A 301.b) példa szerinti vegyületből 2 g-ot oldunk 150 ml o-xilolban, majd a reakcióelegyet 3 órán át 160 °C hőmérsékleten visszafolyatós hűtő alatt forraljuk. Ezután az o-xilolt eltávolítjuk és a maradékot szilikagélen végzett oszlopkromatográfiával tisztítjuk, oldószerként toluol és etil-acetát 98:2 térfogatarányú elegyét használva.

MS (FAB): MH^+ 493.

d) 4-Fluor-5-N-2,2,2-triklór-acetil-amino-2-izopropil-hex-3-énsav

A cím szerinti vegyületet olyan módon állítjuk elő, ahogy ezt D. A. Evans és munkatársai leírták (Org. Synth. **68**, 1990), de kiindulási vegyületként a 301.c) példa szerinti vegyületet használjuk.

MS (FAB): MH^+ 335.

e) 5-Amino-4-fluor-2-izopropil-hex-3-énsav

A 301.d) példa szerinti vegyületből 899 mg-ot oldunk 20 ml etanolban, majd 13,5 ml 6N nátrium-hidroxid-oldatot adunk hozzá. Az így kapott reakcióelegyet 20 órán keverjük szobahőmérsékleten, majd az etanolt eltávolítjuk, és a visszamaradó vizes frakciót 2N sósavoldattal pH = 2 eléréséig megsavanyít-

juk. Ezután az oldatot n-butanollal extraháljuk, az extraktumot bepároljuk és a maradékot szilikagél oszlopon szűrjük, oldószerként diklór-metán és metanol 1:1 térfogatarányú elegyét használva. Így tisztán kapjuk a cím szerinti vegyületet. MS (FAB): MH^+ 190.

f) 4-Fluor-2-izopropil-5-terc-butoxi-karbonil-amino-
-hex-3-énsav

A 301.e) példa szerinti vegyületből 0,56 g-ot feloldunk 12 ml vízben, majd 1,5 g nátrium-karbonátot adunk hozzá. Az így kapott oldathoz 12 ml tetrahidrofuranban oldott 0,4 g di-terc-butyl-karbonátot adunk. A kapott elegyet 18 órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd 50 ml n-butanolt és 50 ml vizet adunk hozzá, és élénk keverés közben 1N sósavoldattal 2-es pH-érték eléréséig megsavanyítjuk. A szerves frakciót lepároljuk és a maradékot szilikagélen végzett oszlopkromatográfiával tisztítjuk, oldószerként hexán és aceton 1:2 térfogatarányú elegyét használva.

MS (FAB): MH^+ 290.

$[\alpha]_D = -61,3^\circ$ (1% metanolban).

A fentebbi eljárásokat megismételve, de a megfelelő kiindulási anyagokat használva az alábbi vegyületek állíthatók elő:

4-fluor-2-metil-5-terc-butoxi-karbonil-amino-hex-3-énsav,
4-klór-2-metil-5-terc-butoxi-karbonil-amino-hex-3-énsav,
4-fluor-2-benzil-5-terc-butoxi-karbonil-amino-hex-3-énsav,
4-klór-2-izopropil-5-terc-butoxi-karbonil-amino-hex-3-énsav,

4-metil-2-izopropil-5-terc-butoxi-karbonil-amino-hex-3-énsav.

302. példa

A 300. példában ismertetett eljárást követve, de a megfelelő kiindulási anyagokat használva az alábbi vegyületek állíthatók elő:

- (5-amino-4-fluor-2-metil)-hex-3-enoil-(3-36)hPTH-amid
MS (ionpermet): tömeg 4245;
- (5-amino-4-klór-2-metil)-hex-3-enoil-(3-36)hPTH-amid
MS (ionpermet): tömeg 4260;
- (5-amino-4-fluor-2-benzil)-hex-3-enoil-(3-36)hPTH-amid
MS (ionpermet): tömeg 4320;
- (5-amino-4-klór-2-izopropil)-hex-3-enoil-(3-36)hPTH-amid
MS (ionpermet): tömeg 4289;
- (5-amino-4-metil-2-izopropil)-hex-3-enoil-(3-36)hPTH-amid
MS (ionpermet): tömeg 4269.

303. példa

A 300. példában ismertett eljárást követve, de a megfelelő kiindulási anyagokat használva a következő vegyületek állíthatók elő:

- a) (5-amino-3-aza-2-izopropil)-hexanoil-(3-36)hPTH-amidot
[MS (ionpermet): 4257] használva kiindulási anyagként:
(4-aza-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-izopropil)-

-hexánsav;

- b) (5-amino-3-aza-3-N-acetil-2-izopropil)-hexanoil-(3-36)hPTH-amidot [MS (ionpermet): 4299] használva kiindulási anyagként:
(4-aza-4-N-acetil-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-izopropil)-hexánsav;
- c) (5-amino-3-aza-3-N-acetil)-hexanoil-(3-36)hPTH-amidot [MS (ionpermet): 4257] használva kiindulási anyagként:
(4-aza-4-N-acetil-2-terc-butoxi-karbonil-amino)-hexánsav;
- d) (5-metil-amino-3-aza-2-izopropil)-hexanoil-(3-36)hPTH-amidot [MS (ionpermet): 4271] használva kiindulási anyagként:
(4-aza-2-(N-terc-butoxi-karbonil,N-metil-amino)-5-izopropil)-hexánsav;
- e) (5-metil-amino-3-aza-3-N-metil-2-izopropil)-hexanoil-(3-36)hPTH-amidot [MS (ionpermet): 4285] használva kiindulási anyagként:
(4-aza-4-N-metil-2-(N-terc-butoxi-karbonil-amino,N-metil-amino)-5-izopropil)-hexánsav;
- f) (5-amino-3-aza-3-N-metil-2-izopropil)-hexanoil-(3-36)hPTH-amidot [MS (ionpermet): 4271] használva kiindulási anyagként:
(4-aza-4-N-metil-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-izopropil)-hexánsav;
- g) (5-amino-3-aza-3-N-izopropil)-hexanoil-(3-36)hPTH-amidot [MS (ionpermet): 4257] használva kiindulási anyagként:

(4-aza-4-N-izopropil-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-
-izopropil)-hexánsav;

h) [1-ciklopentán-1-amino-1-karbonsav(ψi CH₂-NH)-
-Val²]- (3-36)hPTH-amidot használva kiindulási
anyagként:

1-ciklopentán-1-terc-butoxi-karbonil-amino-1-karbonsav
(ψi CH₂-NH)-Val-OH.

304. példa

A 3.a) példa szerinti eljárást követve, de a megfelelő
kiindulási anyagot használva az alábbi vegyületet lehet elő-
állítani:

(5-amino-3-aza-2-izopropil)-hexanoil-
-[Leu⁸,Ala¹⁶,Gln¹⁸,Ala¹⁹](3-36)hPTH-OH-t [MS (ion-
permet): 4135] használva kiindulási anyagként:
(4-aza-2-terc-butoxi-karbonil-amino)-hexánsav

305. példa

**(4-Aza-4-N-acetil-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-
-izopropil]-hexánsav**

a) Metil-(4-aza-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-izopro-
pil)-hexánsav

Boc-Ala-Val-OMe-t Lawesson-reagenssel kezelünk [S.-O.
Lawesson és munkatársai, Tetrahedron **37**, 3635 (1981)]. Ezután
az így kapott endotiopeptidet Guzic F. S. és munkatársai
módszerével (THL, 1990, 23-26) redukáljuk.

MS (EI): MH⁺ 289.

b) Metil-(4-aza-4-N-acetil-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-izopropil)-hexanoát

A 305.a) vegyületből 264 mg-ot oldunk 5 ml diklór-metánban, majd 0,14 ml trietil-amint és 0,072 ml acetil-kloridot adunk hozzá. Az elegyet 24 órán át 40 °C hőmérsékleten keverjük. 50 ml diklór-metán hozzáadása után az oldatot vízzel kétszer mossuk. A szerves frakciót szárítjuk és bepároljuk. Az így kapott, cím szerinti vegyületet oszlopkromatográfiával tisztítjuk, oldószerként hexán és etil-acetát 4:1 térfogatarányú elegyét használva.

MS (EI): M^+ 330.

c) (4-aza-4-N-acetil-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-izopropil)-hexánsav

A 305.b) példa szerinti vegyületből 356 mg-ot oldunk metanol és víz 3:1 térfogatarányú elegyének 4 ml-ében, majd 53 mg lítium-hidroxidot adunk hozzá. Az elegyet 60 °C hőmérsékleten 2 órán át keverjük, majd 25 ml diklór-metánt, továbbá élénk keverés közben 2-es pH-érték eléréséig 1N sósavoldatot adunk hozzá. A szerves frakciót elkülönítjük, szárítjuk és bepároljuk. Ilyen módon tiszta alakban kapjuk a cím szerinti vegyületet.

MS (FAB): MH^+ 317.

Ezt az eljárást megismételve, de a megfelelő kiindulási anyagokat használva az alábbi vegyületeket állíthatjuk elő:

(4-aza-4-N-acetil-2-terc-butoxi-karbonil-amino)-hexánsav,

(4-aza-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-izopropil)-hexánsav,

[4-aza-2-(N-terc-butoxi-karbonil,N-metil-amino)-5-izopropil]-

-hexánsav,
 (4-aza-4-N-metil-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-izopropil)-
 -hexánsav,
 (4-aza-4-N-izopropil-2-terc-butoxi-karbonil-amino-5-izo-
 propil)-hexánsav,
 (4-aza-2-terc-butoxi-karbonil-amino)-hexánsav.

Az 1-300. és 302-304. példák szerinti vegyületek mennyi-
 ségi aminosavelemzés során a helyes aminosavarányokat mutat-
 ják.

A találmány szerinti rekombináns eljárást szemléltető
 alábbi példákban - ha mást nem adunk meg - az Ausubel és
 munkatársai által leírt (Current Protocols in Molecular
 Biology, John Wiley & Sons, New York, 1991) szokásos módsze-
 reket használjuk.

306. példa

A T4 bakteriofág gp55 génjének klónozása

Tisztított T4 DNS-t templatként használva, polimeráz
 láncreakció (PCR) útján két különböző DNS fragmentumot
 amplifikálunk, melyek közül az egyik a T4 bakteriofág gp55
 génjének teljes kódoló régióját, a másik pedig a kódoló régi-
 ónak egy részletét tartalmazza. Láncindítóként olyan oligo-
 nukleotidokat használunk, melyek tartalmazzák az NdeI, illet-
 ve a BamHI endonukleáz felismerő helyének szekvenciáját. A
 teljes gén amplifikálásához a PCR reakciókat (25 ciklus, cik-
 lusonként: 30" 94 °C, 30" 50 °C, 30" 75 °C) 1 ng templáton 100
 pmol/l 5' vég felőli láncindító oligonukleotid (szekvencia

azonosítószám: 5, az NdeI felismerő helyet a 7-12. nukleotidok kódolják) és 100 pmol/l 3' vég felőli láncindító oligonukleotid (szekvencia azonosítószám: 6, a BamHI felismerő helyet az 5-10. nukleotidok kódolják) jelenlétében, 100 µl reakciópufferben végezzük, amely a következő összetevőket tartalmazza: 10 mmol/l Tris-HCl; 50 mmol/l KCl; 1,5 mmol/l MgCl₂; 0,2 mmol/l dATP; 0,2 mmol/l dCTP; 0,2 mmol/l dGTP; 0,2 mmol/l dTTP; 0,1 % Triton X 100; pH 9,0. Egy 0,6 kb (kilobázis) hosszúságú amplifikálódott fragmentumot kapunk.

A gp55 gén rövidített változatát is PCR alkalmazásával, a teljes gén esetében leírtak szerint állítjuk elő, azzal a különbséggel, hogy 3' vég felőli láncindítóként más oligonukleotidot alkalmazunk (szekvencia azonosítószám: 7, a BamHI felismerő helyet az 5-10. nukleotidok kódolják). Ily módon egy 0,35 kb hosszúságú amplifikálódott fragmentumot kapunk.

Mind a 0,6, mind a 0,35 kb-os fragmentumot megemésztjük NdeI és BamHI restrikciós endonukleázokkal, és NdeI/BamHI emésztett pET17B expressziós vektorba (Novagen-től beszerezve) klónozzuk őket. A 0,6 kb DNS fragmentum tartalmazza a gp55 fehérje teljes kódoló régióját (188 aminosav, lásd: szekvencia azonosítószám: 1), míg a 0,35 kb fragmentum a gp55 fehérje 12 kD molekulatömegű amino-terminális részletét kódolja (112 aminosav, lásd: szekvencia azonosítószám: 3).

307. példa

Az (1-38)hPTH-OH-t kódoló DNS előállítása és klónozása

PCR alkalmazásával előállítunk a) egy az 1. szekvencia azonosítószám alatti szekvencia 110-115. aminosavainak megfe-

lelő linker peptidet és az (1-38)hPTH-t kódoló DNS fragmentumot vagy b) egy a 3. szekvencia azonosítósza-
m alatti szekvencia 186-191. aminosavainak megfelelő linker peptidet és az
(1-38)hPTH-t kódoló DNS fragmentumot, egy klónozott szinteti-
kus (1-38)PTH kódoló szekvenciát használva templátként.
Láncindítóként az 5' vég felől az a) linkert (szekvencia azo-
nosítósza-
m: 8) vagy a b) linkert (szekvencia azonosítósza-
m: 9) kódoló oligonukleotidokat használunk. A 3' vég felőli
láncindító oligonukleotid szekvenciáját a 10. szekvencia azo-
nosítósza-
m alatt találhatjuk. Az 5' vég felőli láncindítók
BamHI klónozó helyet tartalmaznak, a 3' vég felőli pedig XhoI
helyet tartalmaz (a hasítóhelyeket mindegyik szekvenciában az
5-10. nukleotidok kódolják). A PCR reakciókat a 306. példában
leírtak szerint hajtjuk végre.

A kapott 0,23 kb méretű PCR termékeket BamHI/XhoI hasítás
után a 306. példa alapján előállított, BamHI/XhoI emésztett
gp55-pET17B plazmidba inszertáljuk.

A fúziós fehérjék expresszálása céljából a kialakított
plazmid konstrukciókat *E. coli* BL21 (DE3) LysE sejtekbe
transzformáljuk, és a tenyésztést különálló transzformált
klónokból kiindulva végezzük. A fúziós proteinek termelése
céljából először kiindulási tenyészetet készítünk, amit rotá-
ciós rázógépen egy éjszakán keresztül, 37 °C-on, sejtszapo-
ródást elősegítő táptalajban (Bio 101) inkubálunk. A termelő
tenyészetet 1-5 térfogat % kiindulási tenyészetrel oltjuk be.
A termelő tenyészetet a következő paramétereket betartva fer-
mentáljuk: 37 °C; pH 6,9-7,1; levegőztetés: 10 l/perc; ráza-
tás: 200-400 ford/perc. A fúziós fehérje termelődését

1 mmol/l IPTG hozzáadásával indukáljuk, mihamarabb a tenyészet eléri a körülbelül 1,0 és 5,0 közötti OD₅₅₀ értéket. Az indukció után a fermentációt még 5 órán át folytatjuk, majd az *E. coli* sejteket begyűjtjük, anélkül, hogy megölnénk őket. A sejteket centrifugálással leüleptítjük, majd minta pufferben felszuszpendáljuk őket. Az expresszió megtörténtét SDS-PAGE eljárással ellenőrizzük. A leüleptített sejteket ezután a fehérje izolálásáig fagyasztva tároljuk. Az alkalmazott módszerek és a gazdasejt leírása megtalálható a következő publikációban: Studier és munkatársai, Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes, Methods in Enzymology, Academic Press, 60-89. o., 1990.

308. példa

Fehérjezárványok (inclusion bodies) előállítása

A 307. példa alapján előállított, fagyasztott *E. coli* sejtekből 25 vegyes %-os szuszpenziót készítünk. A pufferben (50 mmol/l Tris pH 8,0; 2 mmol/l DTT; 5 mmol/l benzamidin-HCl; 1,5 mmol/l MgCl₂; 1,0 mmol/l MnCl₂; 10 µg/ml DN-áz I; 2 mg/ml lizozim) és a szuszpenziót egy órán keresztül szobahőmérsékleten rázatással kevertetjük. A felszuszpendált sejteket ezután Manton-Gaulin homogenizátorral homogenizáljuk (két átnyomás, 1200 bar nyomáson), és a keletkező lizátumot jégen tároljuk. A lizátumot jéghideg B pufferrel (50 mmol/l Tris pH 8,0; 2 mmol/l DTT; 5 mmol/l benzamidin-HCl; 4 mmol/l EDTA) kétszeresére hígítjuk, majd 30 percig 27 500 g-vel centrifugáljuk.

A felülúszót a centrifugálás után óvatosan leszívjuk és elöntjük. A csapadékból B pufferben 25 vegyes %-os szuszpenziót készítünk, ismételten átnyomjuk a Manton-Gaulin homogenizátoron, majd a fentiek szerint centrifugáljuk. Ezt az eljárást kétszer megismételjük, először B puffert, majd vizet használva. A kapott fehérjezárvány csapadékot lemérjük és felhasználásig -20 °C-on fagyaszttva tároljuk.

309. példa

A gp55-Asp-Pro-Pro-(1-38)hPTH-OH fúziósfehérje-zárványok szolubilizálása és hasítása

A 308. példa alapján előállított, gp55-Asp-Pro-Pro-(1-38)hPTH tartalmú, fagyasztott fehérjezárványokat 10 mmol/l HCl (analitikai tisztaságú) oldatban, 6 vegyes % koncentrációban felszuszpendáljuk. Az elegyet 24 órán át 50 °C-on inkubáljuk, majd a reakciót azonos térfogatú, 100 mmol/l vizes NaOAc oldat hozzáadásával leállítjuk. A hígított felülúszót 30 percig 27 500 g-vel végzett centrifugálással kitisztítjuk, majd üvegszál szűrőn átszűrjük.

310. példa

A gp55-Asn-Gly-Pro-(1-38)hPTH fúziósfehérje-zárványok szolubilizálása és hasítása

A 308. példa alapján előállított, gp55-Asp-Pro-Pro-(1-38)hPTH tartalmú, fagyasztott fehérjezárványokat 6 mol/l guanidin-HCl-ban (amely tartalmaz 2 mol/l hidroxilamin-HCl-et és a pH-ját LiOH hozzáadásával 9,0-re állítjuk be) feloldjuk úgy, hogy fehérjére hozzávetőleg 5 mg/l-es oldatot kapjunk. A

pH-t ezután további LiOH hozzáadásával ismételten 9,0-re állítjuk be, majd az oldatot 4 órán át 45 °C-on inkubáljuk. A reakciót hangyasav pH 4-ig történő hozzáadásával állítjuk le, majd a reakcióelegyet a 309. példában megadott módon centrifugáljuk és szűrjük.

311. példa

A Gly-Pro-(1-38)hPTH és a Pro-Pro-(1-38)hPTH tisztítása preparatív HPLC eljárással

A hasítási termékeket tartalmazó szűrt felülúszókat analitikai fordított fázisú HPLC eljárással vizsgáljuk (Orpogen HD-Gel-RP-7s-300; 4x150 mm-es oszlop), a koncentrációt ismert mennyiségű (1-38)PTH standarddal (Bachem) való összehasonlítás útján határozzuk meg. Az oszlopot 85 % HPLC A puffer (90 % víz; 10 % acetonitril; 0,1 % TFA) és 15 % HPLC B puffer (10 % víz; 90 % acetonitril; 0,1 % TFA) elegyével ekvilibrálnak, az elúciót pedig 15 percen keresztül, 15 % HPLC B puffertől 100 % HPLC B pufferig tartó gradienssel végezzük, 0,75 ml/perc folyási sebességgel.

A felülúszót a tisztítandó anyag mennyiségétől függően vagy 1,0x25 cm-es, vagy pedig 2,2x25 cm-es C4 Vydac oszlopra visszük. Az oszlopokat 85 % HPLC A puffer és 15 % HPLC B puffer elegyével ekvilibrálnak, sorrendben 4 ml/perc, illetve 10 ml/perc folyási sebességgel. Az elúciót sorrendben 15 % B puffertől 85 % B pufferig, illetve 15 % B puffertől 55 % B pufferig tartó gradienssel végezzük, 80 ml, illetve 300 ml oldattérfogattal.

A Gly-Pro-(1-38)hPTH vagy a Pro-Pro-(1-38)hPTH csúcsokat manuálisan szedjük, és az acetonitrilt később vákuum alatt eltávolítjuk. A peptidkoncentráció meghatározására mind a hasítás után, mind pedig az összegyűjtött frakciókban analitikai HPLC eljárást alkalmazunk. Az oldószermentes peptidoldatokat azonos térfogatú, 100 mmol/l-es nátrium-acetát oldattal hígítjuk, majd a pH-t szükség esetén 5,4-re állítjuk. A kapott oldatot szűrés után (pórusméret: 0,2 μ m) kationcserélő oszlopra visszük (vagy Mono S, vagy SP-Sepharose High Performance töltetet használunk, HR10/10-es vagy XK16/10-es oszlopba töltve), melyet előzőleg 50 mmol/l-es, pH 5,4-es nátrium-acetát pufferrel (C puffer) ekvilibrálnak. Az elúciót 7,5 oszloptérfogat, 0 - 500 mmol/l-es NaCl gradienssel véghez-
zük C pufferben. 10 ml-es frakciókat szedünk, és az X-X-(1-38)hPTH frakciókat összeöntjük. A peptidkoncentrációt az előzőek szerint, HPLC segítségével határozzuk meg.

Ez a tisztítási lépés egyrészt azt a célt szolgálja, hogy peptideken a puffert a fiziológiás körülményeket jobban utánzóra cseréljük, másrészt pedig azoknak a szennyező peptideknek az eltávolítását, melyek magának a fúziós proteinnek az elhasadásával keletkeznek.

312. példa

Az X-X dipeptid enzimatisz eltávolítása az X-X-(1-38)hPTH-OH-ról

A 311. példa alapján előállított, összeöntött peptidfrakciók pH-ját (koncentráció: 1,5-2,0 mg/ml) szilárd Tris hozzáadásával 8,0-ra állítjuk. A kapott oldathoz 1:1000 hígításban

tisztított X-prolil dipeptidázt (0,5 mg/ml, pH 7,2-es PBS-ben) adunk [Nardi és munkatársai, Appl. Env. Microbiol. **57**, (No. 1) 45-50 (1991)], majd az oldatot 24 órán át 37 °C-on inkubáljuk. A reakciót TFA 0,2 %-ig történő hozzáadásával állítjuk le (pH = 5,0), majd a keletkezett (1-38)PTH-t a 6. példában ismertetett preparatív HPLC eljárással izoláljuk. Az oldószer eltávolítása után alikvotokat veszünk N-terminális szekvenciaanalízishez és tömegspektrometriás elemzéshez, majd a terméket liofilizáljuk.

A következőkben a fenti két fúziós protein eljárással elérhető kitermelés jellemző példáit mutatjuk be.

Az **első kitermelési példában** a gp55-Asp-Pro-Pro-(1-38)hPTH-OH módszer jellemző eredményeit mutatjuk be (itt a gp55 gén "rövidített" változatát használjuk).

Részlegesen optimalizált fermentációs körülmények között egy 10 l-es fermentációból 215 g nedves sejt ülepíthető ki centrifugálással. A fúziós fehérje mennyisége a sejt teljes fehérjemennyiségének körülbelül 37 %-át teszi ki. A kapott 215 g nedves sejtből 31 g fehérjezárvány izolálható. A fehérje zárványok 61 % fúziós fehérjét tartalmaznak. Szolubilizálás, hasítás és centrifugálás/szűrés után körülbelül 620 mg Pro-Pro-PTH detektálható. A C4 Vydac HPLC lépés után 580 mg Pro-Pro-PTH marad. Hígítás, Mono S oszlopon végzett kationcserélés és X-prolil-dipeptidázos emésztés (a Pro-Pro-PTH koncentrációt 2 mg/ml-re állítjuk be), HPLC és liofilizálás után 440 mg, teljes biológiai aktivitással rendelkező tiszta terméket kapunk. Az itt közölt adatokból a le-

állított hasítási lépés és a végtermék között 71 %-os kitermelés számítható.

A **második kitermelési példában** a gp55-Asn-Gly-Pro-(1-38)hPTH-OH módszer jellemző eredményeit mutatjuk be (itt a gp55 gén "hosszú" változatát használjuk).

Nem optimalizált fermentációs körülmények között egy 20 l-es fermentációból 78 g, a teljes fehérjemennyiség 50 %-ában fehérjezárványt tartalmazó nedves sejt ülepíthető ki centrifugálással. Lizis és centrifugálás után 18 g, "90 %-os tisztaságú" fehérjezárvány izolálható. A savas leállítási lépés és a centrifugálás/szűrés után körülbelül 470 mg Gly-Pro-PTH detektálható. A C4 Vydac HPLC lépés után 355 mg peptid marad, amely mennyiség az SP-Sepharose oszlopon végzett kationcserélés után 321 mg-ra csökken. A Gly és a Pro aminosavak enzimatisztítását 2 mg/ml koncentrációnál végezzük. A végső HPLC lépés és a liofilizálás után 244 mg, teljes biológiai aktivitással rendelkező tiszta (1-38)hPTH-OH-t kapunk, ami a leállított hasítási lépés és a végtermék között 52 %-os kitermelésnek felel meg.

A 25., 26., 56. és 86-164. példák szerinti vegyületeket a 306-312. példák szerinti eljárást használva is elő lehet állítani.

A találmány szerinti vegyületek szabad alakban vagy gyógyászatilag elfogadható sók és komplexek alakjában értékes farmakológiai tulajdonságokat mutatnak, amit állatkísérletek

igazolnak. Ezért a találmány szerinti vegyületeket a gyógyászatban fel lehet használni.

A találmány szerinti vegyületek biológiai hatékonyságát *in vitro* kísérletekkel bizonyíthatjuk, Marcus és Aurbach módszerével [Endocrinology **85**, 801-810 (1969)] mérve ciklusos AMP szintézisét stimuláló képességüket patkány-oszteoszarkóma UMR 106-06 sejtekben és SaOS-2 humán oszteoszarkóma-sejtekben. A patkány-oszteoszarkóma UMR 106 sejteket egybefolyásig tenyésztjük Eagle-féle táptalajon (Minimum Essential Medium) (10% FCS 12 mélyedést tartalmazó lemezekben), míg az SaOS-2 oszteoszarkóma-sejteket McCoy-féle 5A közegen tenyésztjük (10% FCS). Ezután a közeget 2% FCS-t tartalmazó közegre cseréljük, és mélyedésenként 1-5 μCi [^3H]-adenint adagolunk. Két órával később a sejteket kétszer mossuk szérummentes közeggel és DMEM-ben inkubáljuk (1 mM 3-izobutil-1-metil-xantint tartalmazó 1% BSA), hogy kizárjuk a foszfodiészterázokra gyakorolt hatásokat. 20 perccel később beadagoljuk a vizsgálati anyagokat. A reakciót 15 perc eltelte után hideg 5%-os triklór-ecetsav hozzáadásával leállítjuk és a cAMP-t extraháljuk. A hozam meghatározása céljából hozzáadunk mélyedésenként 0,5 ml olyan hordozóoldatot, amely 5 mM jelzetlen adenint, adenzint, AMP-t, ADP-t, ATP-t és cAMP-t, valamint 0,4 μCi [^{14}C]-adenozint tartalmaz. A [^3H]-cAMP-t 200-400 lyukbősségű rendes Dowex 50W-X4 gyantával és alumínium-oxidos kromatográfiával elkülönítjük, majd mérjük az izotóp mennyiségét. Az eredményeket kontroll oldószer%-ban számoljuk, és az EC_{50} -értékeket DRC-görbékéből határozzuk meg. A találmány szerinti vegyületek az UMR 106-06 patkány- és az SaOS-2 humán

oszteoszarkóma-sejtekben 10^{-11} - 10^{-6} M koncentrációk mellett stimulálják a cAMP-termelést.

A találmány szerinti vegyületek kötődési hajlamot mutatnak PTH-receptorokhoz is, amit az alábbi kísérletek igazolnak.

Csirke [Tyr³⁶](1-36)PTHrP-amidot 2200 Ci/mmol specifikus aktivitásig jódozunk, a laktoperoxidázos módszert használva (Anawa Lab. AG, Wangen). Oposzum-vesesejtekből készített monorétegeket mosunk 200 μ l 1% BSA-t tartalmazó, 1:1 térfogatarányú DMEM:HAM's F12 oldattal, majd 16 °C hőmérsékleten inkubáljuk mélyedésenként 50 000 cpm [¹²⁵I-Tyr³⁶](1-36)chPTHrP-amiddal, 1 μ M [Tyr³⁶](1-36)chPTHrP-amid jelenlétében vagy távollétében. Inkubálás után a sejteket 0,5 ml 4 °C hőmérsékletű közeggel mossuk, 0,5 ml 1N nátrium-hidroxid-oldattal feltárjuk és a radioaktivitást meghatározzuk. A fajlagos kötést úgy határozzuk meg, hogy a teljes kötésből levonjuk a nem-fajlagos kötést. A versengés-görbét SCTFIT használatával elemezzük, nem-lineáris regressziós számítógépprogramot használva [Feyen és munkatársai, Biochem. Biophys. Res. Commun. **187**, 8-13 (1992)], és az adatokat átlagos pK_D értékekként (n = 2-3) adjuk meg. A találmány szerinti vegyületek ebben a vizsgálatban olyan kötődési affinitást mutatnak, amely átlagos pK_D-ként kifejezve 7-től 10-ig terjedő értékeket ad.

A találmány szerinti vegyületek folytonos szubkután infúzió után növelik a plazma kalciumszintjét is például pajzsmirigyüktől megfosztott, 140-170 g súlyú hím Wistar-patkányokban 5 nappal a pajzsmirigy eltávolítása után, ahol a patkányok nyakába Alzet-miniszivattyút implantáltunk, és a

kísérleti vegyületeket 0,3-30 $\mu\text{g}/\text{nap}/\text{patkány}$ sebességgel infúzióval vittük be az állatokba. Ezt követően az 1., a 2., a 3. és a 6. nap reggelén az állatokból retroorbitális pungálással vettünk vért, és a plazma kalcium-koncentrációit fotometrikusan határoztuk meg. Ebben a vizsgálatban a találmány szerinti vegyületek növelték a plazma kalciumszintjét.

Ennek megfelelően a találmány szerinti vegyületek felhasználhatók a csontrendszerrel kapcsolatos minden olyan panasz megelőzésére és kezelésére, amely fokozott kalcium-kivürüléssel vagy reszorpcióval függ össze, vagy amelyben kívánatos a csontban a kalcium megkötése; ilyen betegség például a különböző kórokú osteoporózis (például a juvenilis, a menopauzális, a poszt-menopauzális, a trauma utáni, az idős kor által vagy kortikoszteroid-terápia által vagy inaktivitás által okozott osteoporózis) a törések, az osteopátia, a csontrendszer ásványvesztésével társuló akut és krónikus állapotokat is ideértve, az osteomalácia, a periodontális csontvesztés, vagy az ízületi gyulladás vagy osteoarthritis által okozott csontvesztés vagy a pajzsmirigy csökkent működése következtében fellépő csontvesztés.

A találmány szerinti vegyületek különösen alkalmasak a különböző származású osteoporózisok megelőzésére vagy kezelésére.

A fentebb felsorolt felhasználások esetén az ajánlott napi dózis körülbelül 0,003-10 mg, előnyösen 0,003-3 mg, még előnyösebben 0,01-1 mg találmány szerinti vegyület. A találmány szerinti vegyületek naponta egyszer vagy hetente legálább kétszer adagolandók.

A találmány szerinti vegyületeket szabad alakban vagy gyógyászati lag elfogadható só alakjában vagy komplexekként lehet adagolni. Az ilyen sók és komplexek a szokásos módon állíthatók elő, és a szabad vegyületekhez hasonló nagyságrendű aktivitást mutatnak.

A találmány oltalmi köre kiterjed olyan gyógyászati kompozíciókra is, amelyek a találmány szerinti vegyületet szabad bázis alakjában vagy gyógyászati lag elfogadható só alakjában vagy komplex alakjában tartalmazzák gyógyászati lag elfogadható higítószerrel vagy hordozóval együtt. Az ilyen kompozíciókat a szokásos módon állíthatjuk elő.

A találmány szerinti vegyületek bármilyen szokásos úton adagolhatók, például parenterálisan injektálható oldatok vagy szuszpenziók alakjában, enterálisan, például orálisan, így tabletták vagy kapszulák alakjában, vagy transzdermálisan, nazálisan vagy végbélkúp alakjában.

Az elmondottak alapján a találmány oltalmi köre még az alábbiakra is kiterjed:

a) gyógyszerként való felhasználásra szolgáló találmány szerinti vegyületre vagy annak gyógyászati lag elfogadható sójára vagy komplexére;

b) csontképződés javítására szolgáló módszerre, például minden olyan csontállapot megelőzésére vagy kezelésére, amely fokozott mértékű kalcium-kiürüléssel vagy -reszorpcióval jár, vagy amelyben kívánatos a csontban a kalcium megkötése; ilyen betegségek például a különböző eredetű osteoporózisok (például a juvenilis, a menopauzális, a poszt-menopauzális, a trauma utáni, az idős kor által vagy kortikoszteroid-terápia

által vagy inaktivitás által okozott oszteoporózis), a törések, az oszteopátia - ideértve a csontrendszer mineralizációjával társuló akut és krónikus állapotokat -, az oszteomálacia, a periodontális csontvesztés vagy az ízületi gyulladásnak vagy oszteoarthritisnek tulajdonítható csontvesztés; e módszer felhasználható az ilyen kezelésre rászoruló egyénekben a pajzsmirigy csökkent működésének javítására; ez a módszer abban áll, hogy a rászoruló betegnek a találmány szerinti vegyület vagy e vegyület gyógyászatilag elfogadható sójának vagy komplexének hatásos mennyiségét adagoljuk;

c) egy találmány szerinti vegyületnek vagy e vegyület gyógyászatilag elfogadható sójának vagy komplexének felhasználására a fentebbi b) pont szerinti módszerben felhasználható gyógyászati kompozíció előállítására.

A találmány szerinti vegyületek felhasználhatók más terápia kiegészítésére vagy eredményesebbé tételére, így például csontreszorpció-inhibítort felhasználó terápiában, így oszteoporózis-terápiában, különösen kalciumot, kalcitonint vagy azok analógjait vagy származékait alkalmazó terápiában, így például lazac-, angolna- vagy emberi kalcitonint, szteroidhormont, például egy ösztrogént alkalmazó terápiában vagy olyan terápiában, amely parciális ösztrogén-agonistát vagy ösztrogén és gesztogén kombinációját, bifoszfonátot, D-vitamint vagy azok analógjait vagy kombinációit alkalmazza.

Amikor a találmány szerinti vegyületeket például csontfelszívódást gátló terápiában adjuvánsként alkalmazzuk, az együttesen adagolt inhibitorra vonatkoztatott dózisok természetesen függenek az alkalmazott inhibitor gyógyszer típusá-

tól, például attól, hogy ez a gyógyszer szteroid vagy kalci-tonin, továbbá a kezelendő beteg állapotától, attól, hogy gyógyító vagy megelőző terápiáról van-e szó, a beteg étrend-jétől és így tovább.

Az elmondottakkal összhangban a találmány még

d) módszert szolgáltat a csontképződés javítására, például a kalcium-kiürülés megelőzésére vagy kezelésére, így a fentebb felsorolt sajátos állapotok vagy betegségek megelőzé-sére vagy kezelésére olyan egyéneknél, akik rászorulnak az ilyen kezelésre; ez a módszer abban áll, hogy az említett egyénnek a) a találmány szerinti vegyületből és b) egy máso-dik gyógyszerből hatásos mennyiséget adagolunk, ahol a máso-dik gyógyszer egy csontreszorpció-inhibitor, például a fen-tebb ilyen vonatkozásban említett anyagok bármelyike.

Ilyen célra előnyösen alkalmazhatjuk a 20., a 29., a 37., a 49. és az 50. példák szerinti vegyületeket.

Szekvencialista

(1) Általános információ:

(i) Bejelentő:

- (A) Név: SANDOZ LTD
- (B) Utca: postafiók
- (C) Város: Bazel
- (D) Állam: BS
- (E) Ország: Svájc
- (F) Irányítószám: CH 4002
- (G) Távbeszélő: 061 324 1111
- (H) Telefax: 061 322 7572
- (I) Telex: 965 050 55

(ii) A találmány címe: Szerves vegyületek

(iii) A szekvenciák száma: 12

(iv) Számítógéppel olvasható forma:

- (A) A hordozó típusa: hajlékony lemez
- (B) Számítógép: IBM PC kompatibilis
- (C) Operátor rendszer: PC-DOS/MS-DOS
- (D) Szoftver: PatentIn Release 1.0, Version
1.25 (EPO)

(2) Információk az 1. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

- (A) Hossz: 717 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Szálszám: egyes

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(v) Fragmentum-típus: belső

(vi) Eredeti forrás:

(A) Organizmus: T4 bakteriofág/Homo sapiens

(ix) Tulajdonság:

(A) Név/kulcs: CDS

(B) Elhelyezkedés: 101...559

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 1

AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCACAAC GGTTTCCTC	60
TAGAAATAAT TTIGTTTAAC TTTAAGAAGG AGATATACAT ATG TCA GAA ACT AAG	115
Met Ser Glu Thr Lys	5
1	
CCT AAA TAT AAT TAC GTA AAC AAT AAA GAG CTT TTA CAA GCT ATT ATT	163
Pro Lys Tyr Asn Tyr Val Asn Asn Lys Glu Leu Leu Gln Ala Ile Ile	20
10	
GAT TGG AAA ACA GAA TTA GCA AAT AAT AAA GAC CCA AAT AAA GTA GTT	211
Asp Trp Lys Thr Glu Leu Ala Asn Asn Lys Asp Pro Asn Lys Val Val	35
25	
30	
CGT CAG AAT GAT ACT ATC GGA TTA GCC ATT ATG CTT ATT GCA GAA GGC	259
Arg Gln Asn Asp Thr Ile Gly Leu Ala Ile Met Leu Ile Ala Glu Gly	50
40	
45	
TTA TCT AAA CGT TTC AAC TTT TCA GGA TAC ACC CAG TCT TGG AAA CAA	307
Leu Ser Lys Arg Phe Asn Phe Ser Gly Tyr Thr Gln Ser Trp Lys Gln	65
55	
60	
GAA ATG ATT GCA GAT GGT ATA GAA GCT TCT ATT AAG GGG CTT CAC AAT	355
Glu Met Ile Ala Asp Gly Ile Glu Ala Ser Ile Lys Gly Leu His Asn	85
70	
75	
80	
TTT GAT GAA ACG AAA TAT AAA AAC CCA CAT GCG TAT ATA ACT CAA GCT	403
Phe Asp Glu Thr Lys Tyr Lys Asn Pro His Ala Tyr Ile Thr Gln Ala	100
90	
95	
TGT TTT AAT GCA TTC GTC CAA CGT GGA TCC ATC GAT CCA CCA TCC GTA	451
Cys Phe Asn Ala Phe Val Gln Arg Gly Ser Ile Asp Pro Pro Ser Val	115
105	
110	
TCA GAA ATA CAA CTA ATG CAT AAT CTG GGT AAA CAT CTG AAT TCA ATG	499
Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Met	130
120	
125	
130	

GAA CGT GTA GAA TGG CTG CGT AAA AAA CTG CAG GAT GTA CAT AAT TTT	547
Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn Phe	
135 140 145	
 GTA GCT CTG GGT TAACTCGAGC AGATCCGGCT GCTAACAAAG CCCGAAAGGA	599
Val Ala Leu Gly	
150	
 AGCTGAGTTG GCTGCTGCCA CCGCTGAGCA ATAAGTAGCA TAACCCCTTG GGGCCCTTGG	659
 GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAAGTATAT CCGGATAA	717

(2) Információk a 2. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

(A) Hossz: 153 aminosav

(B) Típus: aminosav

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: protein

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 2

Met 1	Ser	Glu	Thr	Lys 5	Pro	Lys	Tyr	Asn	Tyr 10	Val	Asn	Asn	Lys	Glu 15	Leu
Leu	Gln	Ala	Ile 20	Ile	Asp	Trp	Lys	Thr 25	Glu	Leu	Ala	Asn	Asn 30	Lys	Asp
Pro	Asn	Lys 35	Val	Val	Arg	Gln	Asn 40	Asp	Thr	Ile	Gly	Leu 45	Ala	Ile	Met
Leu	Ile 50	Ala	Glu	Gly	Leu	Ser 55	Lys	Arg	Phe	Asn	Phe 60	Ser	Gly	Tyr	Thr
Gln 65	Ser	Trp	Lys	Gln	Glu 70	Met	Ile	Ala	Asp	Gly 75	Ile	Glu	Ala	Ser	Ile 80
Lys	Gly	Leu	His 85	Asn	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys 90	Tyr	Lys	Asn	Pro	His 95	Ala
Tyr	Ile	Thr	Gln 100	Ala	Cys	Phe	Asn	Ala 105	Phe	Val	Gln	Arg 110	Gly	Ser	Ile
Asp	Pro	Pro 115	Ser	Val	Ser	Glu	Ile 120	Gln	Leu	Met	His	Asn 125	Leu	Gly	Lys
His	Leu 130	Asn	Ser	Met	Glu	Arg 135	Val	Glu	Trp	Leu	Arg 140	Lys	Lys	Leu	Gln
Asp 145	Val	His	Asn	Phe	Val 150	Ala	Leu	Gly							

(2) Információk a 3. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

(A) Hossz: 945 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Szálszám: egyes

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: DNS (genóm)

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(v) Fragmentum-típus: belső

(vi) Eredeti forrás:

(A) Organizmus: T4 bakteriofág/Homo sapiens

(ix) Tulajdonság:

(A) Név/kulcs: CDS

(B) Elhelyezkedés: 101...787

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 3

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



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

(2) Információk a 4. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

(A) Hossz: 229 aminosav

(B) Típus: aminosav

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: protein

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 4

Met Ser Glu Thr Lys Pro Lys Tyr Asn Tyr Val Asn Asn Lys Glu Leu 1 5 10 15	
Leu Gln Ala Ile Ile Asp Trp Lys Thr Glu Leu Ala Asn Asn Lys Asp 20 25 30	



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

(2) Információk az 5. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

- (A) Hossz: 27 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Szálszám: egyes
- (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(v) Fragmentum-típus: belső

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 5

GAGGTGCATA TGTCAGAAAC TAAGCCT

(2) Információk a 6. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

(A) Hossz: 40 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Szálszám: egyes

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(v) Fragmentum-típus: belső

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 6

GGTCGGATCC ATCGTTAGCG TTAGCCTCAT ATAAAAAATC

40

(2) Információk a 7. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

(A) Hossz: 28 bázispár

(B) Típus: nukleinsav

(C) Szálszám: egyes

(D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(v) Fragmentum-típus: belső

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 7

GGTCGGATCC TACGTTGGAC GAATGCAT

28

(2) Információk a 8. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

- (A) Hossz: 42 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Szálszám: egyes
- (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(v) Fragmentum-típus: belső

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 8

GAGTGGATCC ATCGATCCAC CATCCGTATC AGAAATACAA CT 42

(2) Információk a 9. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

- (A) Hossz: 42 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Szálszám: egyes
- (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(v) Fragmentum-típus: belső

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 9

GAGTGGATCC GTTAACGGTC CATCCGTATC AGAAATACAA CT 42

(2) Információk a 10. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

- (A) Hossz: 34 bázispár
- (B) Típus: nukleinsav
- (C) Szálszám: egyes
- (D) Topológia: lineáris

(ii) Molekulatípus: cDNS

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(v) Fragmentum-típus: belső

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 10

TCTACTCGAG TTAACCCAGA GCTACAAAAT TATG

34

(2) Információk a 11. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

- (A) Hossz: 34 aminosav
- (B) Típus: aminosav
- (C) Szálszám: egyes
- (D) Topológia: ismeretlen

(ii) Molekulatípus: protein

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

- (A) Organizmus: Homo sapiens

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 11

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

Asp Phe

(2) Információk a 12. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

(A) Hossz: 36 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Szálszám: egyes

(D) Topológia: ismeretlen

(ii) Molekulatípus: protein

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) Organizmus: Homo sapiens

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 12

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

(2) Információk a 13. azonosítószámú szekvenciához:

(i) Szekvencia-jellemzők:

(A) Hossz: 38 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Szálszám: egyes

(D) Topológia: ismeretlen

(ii) Molekulatípus: protein

(iii) Hipotetikus: nem

(iv) Antiszensz: nem

(vi) Eredeti forrás:

(A) Organizmus: Homo sapiens

(xi) A szekvencia leírása: szekvencia azonosítószám: 13

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 Val Ala Leu Gly
35

Szabadalmi igénypontok

1. 34-38 aminosavegységet tartalmazó humán PTH-vegyület N-terminális fragmentuma, amelyben a hPTH-szekvencia 8-as, 9-es, 10-es, 11-es, 16-os, 17-es, 18-as, 19-es, 33-as és/vagy 34-es helyzetű α -aminosav-egységei közül legalább egy ki van cserélve egy olyan α -aminosav-egységre, amely a hPTHrP megfelelő helyzetében van jelen, és a 10-es helyzetű α -aminosav adott esetben Gly, Gln, Glu, His, Ser, Thr vagy Tyr lehet és/vagy a 13-as helyzetű α -aminosav Arg-tól eltérő D- vagy L- α -aminosav lehet és/vagy a 16-os helyzetű α -aminosav adott esetben egy D- vagy L- α -aminosav lehet és/vagy a 17-es helyzetű α -aminosav Ala, Ser, Glu, Gln, Phe, His, Ile vagy Lys is lehet és/vagy a 18-as helyzetű α -aminosav adott esetben Gln vagy Tyr is lehet és/vagy a 19-es helyzetű α -aminosav adott esetben Ala, Val, Tyr, Ser, Lys, Met, His, Gly, Pro, Asn vagy Ile is lehet és/vagy a 26-os helyzetű α -aminosav adott esetben Gln vagy Arg is lehet és/vagy a 33-as helyzetű α -aminosav adott esetben egy D- vagy L- α -aminosav is lehet, és adott esetben a vegyület a terminális aminocsoportjához kapcsolódva legalább egy L- vagy D- α -aminosav-csoportot, C_{2-6} alkoxi-karbonil-csoportot vagy adott esetben szubsztituált C_{1-8} alkil-csoportot, C_{2-8} alkenilcsoportot, C_{2-8} alkinilcsoportot, aralkilcsoportot, aralkenilcsoportot vagy C_{3-6} cikloalkil- C_{1-4} alkil-csoportot és/vagy egy vagy több oldalláncbeli aminocsoportjához kapcsolódva legalább egy C_{2-6} alkoxi-karbonil-csoportot vagy adott

esetben szubsztituált C_{1-8} alkilcsoportot, C_{2-8} alkenilcsoportot, C_{2-8} alkinilcsoportot, aralkilcsoportot, aralkenilcsoportot vagy C_{3-6} cikloalkil- C_{1-4} alkil-csoportot tartalmaz, azzal a megkötéssel, hogy

a vegyület eltérő az olyan (1-34)hPTH-vegyülettől, amelyben a 8-as és/vagy a 18-as helyzetű α -aminosav Leu; és/vagy a 11-es helyzetű α -aminosav Lys; és/vagy a 19-es helyzetű α -aminosav Arg; és adott esetben legalább egy további α -aminosav-egység ki van cserélve az alábbi módon: a 13-as helyzetű α -aminosav Leu és/vagy a 19-es helyzetű α -aminosav Lys, Asn vagy His,

szabad alakban vagy só alakjában vagy komplex alakban.

2. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amelyben a hPTH-szekvencia 8-as, 10-es, 11-es, 33-as és/vagy 34-es helyzeteiben levő α -aminosav-egységek közül legalább az egyik Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Thr³³ vagy Ala³⁴.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti vegyület, amelyben a 13-as helyzetű α -aminosav D- vagy L-Ala, -Cys, -Gln, -Ile, -Asn, -Trp, -Asp, -Val, -Ser, -Thr, -Tyr, -Met, -Leu vagy -Gly; és/vagy a 16-os helyzetű α -aminosav D- vagy L-Lys, -Ser, -Leu, -Ala, -Gln vagy -Gly; és/vagy a 33-as helyzetű α -aminosav D- vagy L-Ser, -Leu, -Gly, -Gln, -Arg, -Pro, -Asp, -Ile vagy -Lys.

4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti alábbi PTH-vegyületek: [Leu⁸, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH, [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH,

[Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH,
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸]hPTH,
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH,
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸]hPTH,
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹]hPTH,
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹, Thr³³, Ala³⁴]hPTH és
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴]hPTH,

amely adott esetben tartalmaz az amino-végcsoportjához kapcsolódva legalább egyet az alábbi csoportok közül: L- vagy D- α -aminosav, C₂₋₈ alkoxi-karbonil-csoport és adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkilcsoport, C₂₋₈ alkenilcsoport, C₂₋₈ alkinilcsoport, aralkilcsoport, aralkenilcsoport vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoport és/vagy egy vagy több oldal-láncbeli aminocsoportjához kapcsolódva legalább egyet az alábbi csoportok közül: C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoport és adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkilcsoport, C₂₋₈ alkenilcsoport, C₂₋₈ alkinilcsoport, aralkilcsoport, aralkenilcsoport vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkilcsoport.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a C-terminális csoport -COOH, észterezett -COOH, -CONH₂ vagy mono- vagy diszubsztituált -CONH₂.

6. Az előző igénypontok bármelyike szerinti alábbi vegyületek:

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

[Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴](1-34)hPTH-OH,
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹](1-36)hPTH-OH,
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Thr³³, Ala³⁴](1-34)hPTH-OH
 [Leu⁸, Asp¹⁰, Lys¹¹, Ala¹⁶, Gln¹⁸](1-36)hPTH-OH és
 [Leu⁸, Ala¹⁶, Gln¹⁸, Ala¹⁹](1-36)hPTH-OH
 szabad alakban vagy só vagy komplex alakjában.

7. Eljárás egy 1. igénypont szerinti vegyület előállítására, **azzal jellemezve**, hogy egy olyan fúziós proteint, amely a C-terminálisához kapcsolva a kívánt polipeptidet tartalmazó N-terminális T4 bakteriofág gp55 polipeptidet tartalmazza, baktériumsejtekben expresszálunk, és kívánt esetben egy C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoportot vagy egy az amino végcsoporthoz kapcsolódó, adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkil-, C₂₋₈-alkenil-, C₂₋₈ alkinil-, aralkil-, aralkenil- vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoportot bevezetünk a vegyületbe, amely védett vagy nem-védett alakban lehet, és kívánt esetben eltávolítjuk a védőcsoportot a védett alakról.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy két peptidfragmentumot amidkötéssel összekapcsolunk, ahol a peptidfragmentumokat úgy választjuk meg, hogy a kívánt vegyület kívánt aminosavszekvenciáját kapjuk, és kívánt esetben a védett vagy nem-védett alakban levő vegyület terminális és/vagy oldalláncbeli aminosavcsoportjába C₂₋₆ alkoxi-karbonil-csoportot vagy adott esetben szubsztituált C₁₋₈ alkilcsoportot, C₂₋₈ alkenilcsoportot, C₂₋₈ alkinilcsoportot, aralkilcsoportot, aralkenilcsoportot vagy C₃₋₆ cikloalkil-C₁₋₄ alkil-csoportot viszünk be, és kívánt esetben a vé-

dett alakban levő vegyületből eltávolítjuk a jelenlevő védőcsoportot.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a fúziós protein a gp55 és az Asp-Pro-Pro vagy Asn-Gly-Pro aminosav-szekvenciákat tartalmazó kívánt polipeptidek között kémiaailag hasítható linkert tartalmaz.

10. Gyógyászati kompozíció, amely az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti vegyületet tartalmazza szabad alakban vagy gyógyászatilag elfogadható só vagy komplex alakjában, gyógyászatilag elfogadható hígítószerrel vagy hordozóval együtt.

11. A 10. igénypont szerinti gyógyászati kompozíció csontreszorpciós inhibitorral együtt.

SANDOZ A.G. helyett

a meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

