



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 38 331 T2** 2008.05.21

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 007 568 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 38 331.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/14284**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 935 594.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/010381**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.07.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **04.03.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **29.08.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **21.05.2008**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C07K 14/78** (2006.01)  
**A61K 38/39** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**918223 25.08.1997 US**

(73) Patentinhaber:

**Wisconsin Alumni Research Foundation,  
Madison, Wis., US**

(74) Vertreter:

**LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**RAINES, Ronald T., Madison, WI 53704-5735, US**

(54) Bezeichnung: **KOLLAGENÄHNLICHE VERBINDUNGEN**

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

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

### Beschreibung

**[0001]** Kollagen ist das häufigste Protein bei Vertebraten, das in praktisch jedem Gewebe auftritt, einschließlich Haut, Sehnen, Knochen, Blutgefäßen, Knorpel, Bändern und Zähnen. Kollagen dient in Geweben von Vertebraten als das wesentliche Strukturprotein. Kollagenanomalien werden mit vielen verschiedenen humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht, einschließlich Arthritis, Rheumatismus, Glasknochen, Atherosklerose, Zirrhose und Grauem Star. Auch bei der Wundheilung ist Kollagen von entscheidender Bedeutung. Ein verbessertes Verständnis von der Kollagenstruktur und darüber, wie die Struktur die Kollagenstabilität beeinflusst, erleichtert die Entwicklung von neuen Behandlungen von mit Kollagen verbundenen Erkrankungen und die Entwicklung von verbesserten Behandlungen zur Wundheilung.

**[0002]** Kollagen ist ein faserförmiges Protein, das in einer Vielzahl von verwandten Formen vorkommen kann. Säuger produzieren mindestens 17 verschiedene Polypeptidketten, die bei einer Kombination mindestens 10 Kollagenvarianten bilden. Bei jeder dieser Varianten sind die Polypeptidketten des Kollagens aus ungefähr 300 Wiederholungen der Sequenz X-Y-Gly zusammengesetzt, worin X oft ein Prolin (Pro)-Rest und Y oft ein 4(R)-Hydroxyprolin (Hyp)-Rest ist. Im Bindegewebe (wie etwa Knochen, Sehnen, Knorpel, Bänder, Haut, Blutgefäße und Zähne) sind einzelne Kollagenmoleküle in engen Tripelhelices miteinander verwickelt. Diese Helices sind in Fasern mit einer großen Zugfestigkeit organisiert, Jones & Miller, *J. Mol. Biol.*, 218: 209–219 (1991). Eine Variation der Anordnungen und Vernetzungen der Kollagenfasern ermöglicht es Vertebraten, eine eindimensionale Belastung (Sehnen), eine zweidimensionale Belastung (Haut) oder eine dreidimensionale Belastung (Knorpel) abzustützen.

**[0003]** Bei Vertebraten wird das Kollagenpolypeptid mit dem typischen Wiederholungsmotiv translatiert, welches mit ProProGly beginnt. In vivo wird danach die Hydroxylierung von Pro-Resten enzymatisch nach der Kollagenbiosynthese durchgeführt, jedoch ehe die Ketten beginnen, eine Tripelhelix zu bilden. Folglich könnte die Hydroxylierung sowohl für die Kollagenfaltung als auch für die Kollagenstabilität wichtig sein. Es ist seit langem bekannt, dass die Hydroxylgruppe von Hyp-Resten die thermische Stabilität von Tripelhelixkollagen erhöht, Berg und Prockop, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 52: 115–120 (1973). Die Schmelztemperatur einer Tripelhelix aus (ProHypGly)<sub>10</sub>-Ketten beträgt beispielsweise 58°C, wogegen die Schmelztemperatur einer Tripelhelix aus (ProProGly)<sub>10</sub>-Ketten nur 24°C beträgt, Sakakibara et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 303: 198–202 (1973). Außerdem ist die Geschwindigkeit, mit welcher (ProHypGly)<sub>10</sub>-Ketten zu einer Tripelhelix gefaltet werden, wesentlich größer als die entsprechende Geschwindigkeit bei (ProProGly)<sub>10</sub>-Ketten, Chopra und Ananthanarayanan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 7180–7184 (1982). Die molekulare Grundlage für diese beobachteten Effekte ist jedoch nicht klar.

**[0004]** Ein molekulares Modellieren auf Grundlage der Struktur von Tripelhelixkollagen und Berechnungen der Konformationsenergie deuten darauf hin, dass zwischen der Hydroxylgruppe der Hyp-Reste und beliebigen Hauptkettengruppen von jedem der Kollagenmoleküle in der gleichen Tripelhelix keine Wasserstoffbindungen gebildet werden können, Okuyama et al., *J. Mol. Biol.*, 152: 427–443 (1981). Mehrere Modelle beziehen die Hypothese ein, dass Hydroxyprolin die Stabilität von Kollagen als Ergebnis einer Brücke von Wassermolekülen erhöht, welche zwischen der Hydroxylgruppe und einer Carbonylgruppe der Hauptkette gebildet wird. Für eine Übersicht der Beobachtungen, die diese Hypothese weiterentwickeln, siehe Suzuki et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, 2: 54–56 (1980) und Némethy, in "Kollagen", veröffentlicht von CRC Press (1988) und die darin zitierten Referenzen.

**[0005]** Jedoch existiert ein experimenteller Beweis, welcher zu dem Wassermolekülbrückenmodell im Widerspruch steht. Beispielsweise wurde gefunden, dass die Tripelhelices von (ProProGly)<sub>10</sub> und (ProHypGly)<sub>10</sub> in 1,2-Propandiol stabil sind, und dass die Hyp-Reste in diesen wasserfreien Bedingungen eine zusätzliche Stabilität verliehen haben, Engel et al., *Biopolymers*, 16: 601–622 (1977), was darauf hindeutet, dass Wassermoleküle bei der zusätzlichen Stabilität von (ProHypGly)<sub>10</sub> keine Rolle spielen. Außerdem stehen Messungen der Wärmekapazität im Widerspruch dazu, dass Kollagen pro sechs Gly-X-Y-Einheiten mehr als ein Wasser gebunden hat, Hoeve und Kakivaya, *J. Phys. Chem.*, 80: 754–749 (1976). Entsprechend existiert keine vorrangige endgültige Darstellung des Mechanismus, durch welchen die Hydroxyprolinreste die Kollagentriplexstrukturen stabilisieren.

**[0006]** Ein besseres Verständnis darüber, wie die Struktur von Kollagen zur Kollagenstabilität beiträgt, würde die Gestaltung von Kollagen oder kollagenähnlichen Verbindungen mit einer verbesserten Stabilität erleichtern. Ein Kollagensatz mit einer hohen Stabilität könnte die Entwicklung von Behandlungen zur verbesserten Wundheilung voranbringen.

**[0007]** In den letzten Jahren hat es bei der Wundheilung spannende Entwicklungen gegeben, einschließlich der Entwicklung der Gewebetechnik („Tissue Engineering“) und der Gewebeverschweißung („Tissue Welding“). Die autologe epidermale Transplantation bei der Behandlung von Verbrennungen war beispielsweise ein wesentlicher Fortschritt bei der Gewebetechnik. Die Gewebetechnik hat auch zur Entwicklung von mehreren Arten von künstlicher Haut geführt, wobei bei einigen davon humanes Kollagen als ein Substrat verwendet wird. Jedoch ist ein Hauptproblem, das mit dieser Behandlung verbunden ist, die Fragilität dieser Transplantate während und nach der chirurgischen Behandlung.

**[0008]** Die Gewebeverschweißung ist ein Wundheilungsverfahren, worin ein Laser verwendet wird, um das Kollagen in der Haut am Rand einer Wunde thermisch zu denaturieren. Dadurch, dass dem Kollagen eine Renaturierung erlaubt wird, wird die Wunde wieder gehärtet. Im Fall von großen Wunden ist ein "Füllstoff" oder Lötstoff erforderlich, um eine Wiederverbindung der Wunde zu bewirken. Für diesen Zweck sind verschiedene Materialien, einschließlich humanem Albumin, als Lötstoffe verwendet worden. Ein guter Lötstoff ist elastisch und ist nicht immunogen und sollte bevorzugt mit nativem Kollagen an benachbarten Stellen Wechselwirkungen können.

**[0009]** Kollagen wird auch für eine Vielzahl von anderen medizinischen Zwecken verwendet. Beispielsweise wird Kollagen bei Nahtmaterial verwendet, das durch den menschlichen Körper natürlich abgebaut werden kann und nicht durch eine nachfolgende Bergung entfernt werden muss. Bei der Gestaltung von Kollagennähten ist die Festigkeit der Kollagenfasern manchmal ein beschränkender Faktor. Eine Kollagenvariante oder kollagenähnliche Verbindung mit einer größeren Festigkeit würde bei der Verwendung solcher Kollagennähte durch Verbesserung dieser Beschränkung hilfreich sein.

**[0010]** Was im Fachgebiet benötigt wird, ist ein neuartiges Kollagen mit einer verbesserten Stabilität für die Verwendung bei künstlicher Haut, als ein Lötmedium bei der Gewebeverschweißung und als ein allgemeines Werkzeug zur Verwendung bei der Gestaltung von medizinischen Komponenten.

**[0011]** Fluorprolin (Flp) wurde von Gottlieb et al., *Biochemistry*, 4: 11: 2507–2513 (1965) sowohl als R- als auch als S-Stereoisomer synthetisiert. Gottlieb et al. haben behauptet, dass sie beide Isomere durch eine biosynthetische Route in Kollagen eingebaut hätten, aber diese Behauptung wurde später von Takeuchi et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 175: 156–164 (1969), von Takeuchi und Prockop, *Biochem. Biophys. Acta*, 175: 142–155 (1969) und Uitto und Prockop, *Arch. Biochem. Biophys.*, 181: 293–299 (1977) widerlegt. Da Gottlieb et al. eine Biosynthese verwendeten, wurde das Flp in dem Ausmaß, in dem es überhaupt in die entstehenden Kollagenmoleküle eingebaut wurde, willkürlich anstelle von einigen zufälligen Prolinresten in das Polypeptid eingebaut. Es gibt natürlich kein Codon, das für Flp spezifisch ist. Das Flp war auch ein racemisches Gemisch aus beiden Stereoisomeren, wodurch die Natur der erzeugten Proteine zudem randomisiert wurde, wenn das Flp überhaupt eingebaut wurde, was sehr zweifelhaft ist. Andere haben die chemischen Eigenschaften von Flp untersucht, ohne es in große Polypeptide einzubauen, Gerig und McLeod, *J. Am. Chem. Soc.*, 98: 3970–3975 (1976).

**[0012]** *Helvetica Chimica Acta*, Vol. 61, Fasc. 2 (1978), 701–708 betrifft die Verwendung des Peptids (L-Pro-L-Hyp-Gly)<sub>10</sub> als Modellpeptid für Untersuchungen zur Kollagenstruktur. Die Hydroxyprolinreste können unter Verwendung von Essigsäureanhydrid für weitere Untersuchungen acetyliert werden.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0013]** Zusammenfassend liegt die vorliegende Erfindung darin, dass eine neue Kollagenvariante entwickelt wurde, welche eine stärkere Tripelhelix bildet als natives Kollagen dies tut. Die neue Variante umfasst einen fluorierten Prolinrest, der den Hydroxyprolinrest ersetzt, der für die normalerweise in nativem Kollagen zu findenden dreifachen Wiederholungen typisch ist.

**[0014]** Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein neues, hochstabiles Kollagenmolekül bereitzustellen, welches als ein Bestandteil in künstlicher Haut, als Lötmedium beim Verschweißen von Gewebe oder als ein Ersatz für Kollagen in anderen Anwendungen verwendet werden kann, die eine hohe Festigkeit erfordern.

**[0015]** Es ist ein Merkmal der vorliegenden Erfindung, dass ein Beweis bereitgestellt wird, um die Art der zusätzlichen Stabilität zu zeigen, die dem Kollagen durch den Hyp-Rest hinzugefügt wird, wobei es möglich wird, andere Reste für diese Position zu entwickeln, welche zu dieser Festigkeit beitragen können.

**[0016]** In der vorliegenden Erfindung wird ein neues kollagenähnliches Molekül mit einer verbesserten Festig-

keit gezeigt und es werden alternative Verfahren beschrieben, durch welche dieses Molekül hergestellt werden kann.

**[0017]** Andere Aufgaben, Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung werden bei einem Überblick über die Beschreibung, die Zeichnungen und Ansprüche offensichtlich.

#### Beschreibung der Zeichnungen

**[0018]** [Fig. 1](#) zeigt die Zirkulardichroismusspektren von (Pro-Flp-Gly)<sub>10</sub>, (ProProGly)<sub>10</sub> und (ProHupGly)<sub>10</sub>.

**[0019]** [Fig. 2](#) veranschaulicht den synthetischen Weg für die Herstellung von FmocProFlpGlyOH, wie in den Beispielen unten beschrieben wird.

**[0020]** [Fig. 3](#) veranschaulicht den synthetischen Weg für die Herstellung von (ProFlpGly)<sub>10</sub>, wie in den Beispielen unten beschrieben wird.

#### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

**[0021]** Die Untersuchung, welche zu der hier beschriebenen Arbeit führte, begann mit der Vorstellung, dass ein besseres Verständnis der Faktoren, die zu der dreidimensionalen Struktur und Stabilität von Kollagen beitragen, die Entwicklung einer Kollagenvariante mit einer verbesserten Festigkeit zur Verwendung bei der Wundheilung und die Entwicklung von Behandlungen für Menschen, die an einer mit Kollagen in Zusammenhang stehenden Erkrankung leiden, erleichtern würde. Dies würde auch ein stärkeres Kollagen für allgemeine Zwecke für eine Vielzahl von Verwendungen bereitstellen.

**[0022]** Die dieser Untersuchung zu Grunde liegende Hypothese war die Überzeugung, dass es unwahrscheinlich ist, dass brückenbildende Wassermoleküle wesentlich zur Stabilität von Kollagen beitragen. Erstens würde die Immobilisierung von einem oder mehreren Wassermoleküle für jeden Hyp-Rest einen enormen Entropieaufwand erfordern. Ein Wassermolekül kann 4 Wasserstoffbindungen bilden. Im Volumen einer wässrigen Lösung werden diese 4 Wasserstoffbindungen mit anderen Wassermolekülen gebildet, welche selbst beweglich sind. Im Gegensatz dazu würden die brückenbildenden Wassermoleküle von Kollagen einen weit größeren Entropieverlust erleiden, da zwei ihrer Wasserstoffbindungen mit Kollagen gebildet würden, welches verglichen mit einem Wassermolekül unbeweglich ist.

**[0023]** Zweitens, wenn die brückenbildenden Wassermoleküle des Kollagens tatsächlich für die Stabilität des Kollagens wichtig sind, dann ist es wahrscheinlich, dass sie homogen sind, wobei ein Muster der Wasserstoffbindung überwiegt. Jedoch deutete eine hochaufgelöste dreidimensionale Struktur von dreifach helikalem Kollagen darauf hin, dass einzelne Hyp-Reste an 1, 2, 3 oder 4 Wassermoleküle binden, wobei unregelmäßige, komplexe Netze von Wasserstoffbindungen innerhalb von Ketten oder zwischen Ketten gebildet werden, Bella et al., *Science*, 266: 75–81 (1994). Diese Heterogenität und Komplexität bei der Wasserstoffbindung steht im Widerspruch mit der Hypothese, dass brückenbildende Wassermoleküle dem Kollagen Stabilität verleihen.

**[0024]** Hier wird eine alternative Erklärung für die Kollagenstabilität vorgeschlagen, welche auf den Einfluss von induktiven Effekten auf die Kollagenkonfiguration und Stabilität beruht. Die Hyp-Reste in kristallinem Kollagen besitzen keine ungewöhnlichen  $\Phi$ - oder  $\phi$ -Bindungswinkel. Jedoch verdienen die  $\omega$ -Winkel (welche die Diederwinkel der Peptidbindung darstellen) Betrachtung. Das trans-Isomer (das bedeutet, das Isomer mit  $\omega = 180^\circ$ ) einer Prolinpeptidbindung ist gegenüber dem cis-Isomer (das bedeutet, das Isomer mit  $\omega = 0^\circ$ ) nur leicht bevorzugt. Jedoch sind gemäß der Struktur von kristallinem Kollagen alle Peptidbindungen im Tripelhelixkollagen in der trans-Konformation. Dies führt zu der Hypothese, dass Hyp-Reste die trans-Konformation begünstigen könnten.

**[0025]** Um mit einem Test dieser Hypothese zu beginnen, wurde bestimmt, wie elektronenziehende Gruppen das Verhältnis von trans:cis beeinflussen. N-Acetylprolinmethylester (AcProOMe), N-Acetyl-4(R)-Hydroxyprolinmethylester (AcHypOMe) und N-Acetyl-4(R)-Fluorprolin (AcFlpOMe) wurden synthetisiert und es wurden ihre Präferenzen für den trans-Zustand bestimmt, Eberhardt et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 12261–12266 (1996). Es wurde gefunden, dass das Verhältnis von trans:cis in der Reihenfolge: AcProOMe < AcHypOMe < AcFlpOMe ansteigt (Tabelle 1). Weil das trans-Isomer das einzige in einem Tripelhelixkollagen zu findende Isomer ist, deutet diese Reihenfolge darauf hin, dass der Flp-Rest das Tripelhelixkollagen in größerem Ausmaß stabilisiert als der Hyp-Rest, und dass der Hyp-Rest das Tripelhelixkollagen in größerem Ausmaß stabilisiert als der Pro-Rest.

**[0026]** Der Ursprung dieser Wirkung auf das Verhältnis von trans:cis wurde durch Bestimmung der kristallinen Strukturen von AcProOMe, AcHypOMe und AcFlpOMe untersucht, Panasik et al., Int. J. Pept. Protein Res., 44: 262–269. Es wurde gefunden, dass die Bindungslänge C $\gamma$ -C $\delta$  in der Reihenfolge: AcProOMe > AcHypOMe > AcFlpOMe abnimmt (Tabelle 1). Diese Reihenfolge stimmt mit einem induktiven Effekt überein, worin der Substituent in der 4-Position die Elektronendichte von der C $\gamma$ -C $\delta$ -Bindung abzieht. Eine kürzere C $\gamma$ -C $\delta$ -Bindungslänge vermindert sterische Kollisionen zwischen Atomen im trans-Isomer, hat jedoch auf das cis-Isomer keine Auswirkung. Der induktive Effekt der Hydroxylgruppe von Hyp-Resten stimmt mit dem Effekt von Hyp auf die Kollagenstabilität überein. Von Panasik et al. und Eberhardt et al. wurden auch andere Manifestationen der induktiven Effekte der Hyp- und Flp-Reste gefunden. Ähnliche induktive Effekte sollten sich bei 4(S)-Fluorprolin und in 4,4-Difluorprolin zeigen.

Tabelle 1: Induktiver Effekt auf die Eigenschaften von AcProOMe, AcHypOMe und AcFlpOMe

	Verhältnis trans-cis	$\Delta\Delta G$ (kcal/mol)	C $\gamma$ -C $\delta$ -Bindungslänge (Å)
AcProOMe	4,3	0	1,523
AcHypOMe	5,8	0,18	1,510
AcFlpOMe	6,2	0,22	1,508

**[0027]** Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass, wenn durch die Evolution ein Hyp-Rest in der mittleren Position des dreifachen Wiederholungsmotivs von Kollagen aufgrund des induktiven Effekts, welcher die Elektronendichte in Richtung der Hydroxylgruppe des Hyp-Rests zieht, platziert wurde, dann sollte ein Rest mit einem Substituenten, welcher einen noch größeren induktiven Effekt aufweist, in der Lage sein, eine Kollagentripelhelix zu bilden, welche noch stärker ist als natives Kollagen. Diese Erfindung beruht auf dieser Voraussetzung und die hier dargestellten Daten unterstützen die Hypothese. Die Platzierung des Fluoratoms in der 4-Position im Prolin in 4(R)-Fluorprolin (Flp) und der Einbau von Flp in Kollagentripelhelices, wie unten beschrieben, erhöht in der Tat die Festigkeit der Kollagentripelhelixbildung. Somit wird erstmalig eine intelligente Gestaltung von verbesserten kollagenähnlichen Verbindungen ermöglicht.

**[0028]** Um die Rolle des induktiven Effekts auf die Kollagenstabilität zu untersuchen, wurde die kollagenähnliche Verbindung (Xaa-Flp-Gly)<sub>10</sub> synthetisiert, worin Flp 4(R)-Fluor-L-Prolin ist, wie ausführlich in den Beispielen unten beschrieben wird. In den Flp-Resten übt das Fluoratom einen starken induktiven Effekt aus, bildet jedoch keine Wasserstoffbindungen. Die thermischen Stabilitäten und die Helizität von (ProFlpGly)<sub>10</sub>, (ProProGly)<sub>10</sub> und (ProHypGly)<sub>10</sub> wurden unter Verwendung des Zirkulardichroismus bestimmt. Es wurde gefunden, dass die kollagenähnliche Verbindung (ProFlpGly)<sub>10</sub> ein sehr stabiles Tripelhelixkollagen bildet, stärker als jede der anderen untersuchten Formen. Dies zeigt nicht nur, dass die kollagenähnliche Verbindung (ProFlpGly)<sub>10</sub> als eine kollagenähnliche Verbindung für die Herstellung von Kollagen-kompatiblen Materialien verwendbar ist, sondern auch, dass der kritische Parameter bei der Bildung der Kollagentripelhelixstruktur der induktive Effekt auf die Elektronendichte an der Position 4 im Prolin in der mittleren Position des dreifachen Wiederholungsmotivs ist. Es werden hier auch Formen von kollagenähnlichen Verbindungen mit anderen Aminosäuren an der ersten Position im dreifachen Motiv in Erwägung gezogen.

**[0029]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine kollagenähnliche Verbindung, umfassend ein dreifaches Wiederholungsmotivpeptid mit der Formel (XaaFlpGly)<sub>n</sub>, worin Flp 4(R)-Fluor-L-Prolin ist, n eine positive ganze Zahl ist und Xaa eine beliebige Aminosäure, jedoch normalerweise eine der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ist. In den Beispielen unten besitzen die kollagenähnlichen Verbindungen, die synthetisiert und untersucht wurden, an der Position Xaa einen Prolin-Rest. Es wird angesichts der Tatsache, dass das natürliche Kollagen eine Vielzahl von Aminosäuren an der Xaa-Position aufweist, obwohl Prolin der prototypische Rest an dieser Position wäre, davon ausgegangen, dass andere Aminosäuren außer Prolin an der Xaa-Position toleriert werden. Die Reste an der Xaa-Position können gleich sein oder können bezüglich der Identität entlang eines einzelnen Moleküls variieren.

**[0030]** Das Beispiel unten beschreibt die chemische Synthese eines Kollagens mit der Sequenz (XaaFlpGly)<sub>n</sub>. Die vorliegende Erfindung soll ein Molekül mit dieser Sequenz umfassen, ungeachtet der Art der Synthese. Es wird erwartet, dass ein Fachmann auf dem Gebiet der Synthese von Biopolymeren das Peptid unter Verwendung einer Modifikation der unten beschriebenen chemischen Synthese herstellen kann. Das Molekül kann durch direkte Synthese hergestellt werden, wie unten beschrieben wird. Es wird auch in Erwägung gezogen, dass das Molekül durch Fluorierung der Proline im nativen Kollagen hergestellt werden kann, entweder durch enzymatische Modifikationen der unreifen Kollagenform (ProProGly)<sub>n</sub> oder durch Substitution der Hydroxylgruppe des Hyp im reifen Kollagen (ProHypGly)<sub>n</sub> durch ein Fluoratom.

**[0031]** Es ist derzeit nicht möglich, eine kollagenähnliche Verbindung mit der XaaFlpGly-Tripeptidwiederholung durch eine Biosynthese zu erhalten. Kollagenähnliche Verbindungen, die durch chemische Modifikation von natürlichen Kollagenen erhalten werden, liegen innerhalb des Geistes und des Umfangs der vorliegenden Erfindung.

**[0032]** Der Erfolg der vorliegenden Erfindung beruht auf der bezogen auf die Hydroxylgruppe von Hydroxyprolin überlegenen Fähigkeit von Fluor, Elektronen zu ziehen. Es wird deshalb erwartet, dass eine chemische Modifikation, welche die elektronenziehende Fähigkeit der Hydroxylgruppe verbessert (im Gegensatz zum Ersetzen der Hydroxylgruppe durch ein Fluoratom), die Kollagenstabilität verstärken wird. Es wird angenommen, dass chemische Modifikationen der Hydroxylgruppe von Hydroxyprolin, welche die elektronenziehende Fähigkeit erhöhen, eine kollagenähnliche Verbindung mit einer verbesserten Stabilität ergeben werden. Vorgeschlagene chemische Modifikationen der Hydroxylgruppe von Hydroxyprolin werden unten beschrieben.

#### Beispiel

##### Synthese von definierten, mit Tripelhelixkollagen ähnlichen Verbindungen

**[0033]** In Kürze, (ProFlpGly)<sub>10</sub> wurde durch Segmentkondensation an einer Festphase synthetisiert. FmocProFlpGlyOH-Einheiten wurden aus Flp und kommerziellen Reagenzien durch Standardlösungsphaseverfahren zusammengebaut, wie von Bodanszky in: "The Practice of Peptide Synthesis", 2. Auflage, Springer-Verlag (1994) beschrieben wird. Das Flp wurde so hergestellt, wie es von Panasik et al. in Int. J. Pept. Protein Res., 44: 262–269 (1994) und von Eberhardt et al. in J. Am. Chem. Soc., 118: 12261–12266 (1996) beschrieben wird. Für jeden Strang einer mit Tripelhelixkollagen ähnlichen Verbindung wurden zehn FmocProFlpGlyOH-Einheiten auf einem Z-Chlortritylharz unter Verwendung eines ABI 432A Peptidsyntheseapparats zusammengefügt. Das abgespaltene Peptid wurde durch HPLC auf einer Vydac C-18 Umkehrphasensäule gereinigt. (ProProGly)<sub>10</sub> und (ProHypGly)<sub>10</sub> waren von Peptides International. Alle drei 30-mer wurden durch HPLC und Massenspektrometrie als > 90 % rein eingestuft.

**[0034]** Ausführlicher, die kollagenähnliche Verbindung wurde durch einen Syntheseweg synthetisiert, welcher auf Tripeptideinheiten der Form: FmocX-Y-GlyOH basiert, worin Fmoc N<sup>α</sup>-9-Fluorenylmethoxycarbonyl ist. Die Positionierung eines Glycinrestes am C-Terminus dieser Einheiten vermied Probleme, die während der Festphasenkopplung der aktivierten Peptidfragmente durch Racemisierung (durch Azlactonbildung) verursacht wird. Die Tripeptideinheiten wurden unter Verwendung von Standardlösungsphaseverfahren synthetisiert (Bodanszky, 1994). Die Einheiten wurden eher mit N<sup>α</sup>-tert-Butyloxycarbonyl (Boc) zusammengefügt und nicht mit Fmoc-Schutzgruppen, da Fmoc einer Pd/C-katalysierten Hydrogenolyse nicht standhält, welche zum Erstschiützen des Glycinrests notwendig ist.

**[0035]** Die zur Synthese von FmocProFlpGlyOH (1) verwendete Syntheseroute wird in [Fig. 2](#) gezeigt.

**[0036]** In Kürze, die Reaktion von BocFlpOSu mit GlyOBn ergab ein geschütztes Dipeptid. Die Entfernung der Boc-Gruppe in saurem Dioxan gefolgt von einer Kopplung mit BocProOH ergibt ein geschütztes Tripeptid. Die Entfernung der Benzoylgruppe durch Hydrogenolyse ergibt das Boc-Analogon von 1, das durch Entfernung der Boc-Gruppe und Umsetzung mit FmocOSu in 1 umgewandelt wurde. Alle bei der Synthese der Tripeptide verwendeten Reagenzien waren kommerziell erhältlich.

Tabelle 2: Bei der Synthese der kollagenähnlichen Verbindungen verwendete Tripeptideinheiten

	Position 1	Position 2	Position 3
1	FmocPro-	Flp-	GlyOH

**[0037]** Mittels Festphasenkopplung des Tripeptids 1 wurde ein Peptid synthetisiert, bei welchem die Einzelstränge von Kollagen imitiert werden. Für eine bei Umgebungstemperatur stabile Tripelhelix muss jeder Strang mindestens 7 Tripeptidwiederholungen enthalten. Es wurde eine kollagenähnliche Verbindung synthetisiert, bei welchem jeder Strang 10 Tripeptideinheiten enthält. Dieses 30-mer wurde auf einem 2-Chlortritylharz synthetisiert, welches einer Festphasensynthese mit Fmoc-Aminosäuren zugänglich ist und die Spaltung des Polypeptids vom Harz ohne Seitenkette oder α-Aminogruppenentschützung ermöglicht, Fields and Noble, Int. J. Pept. Protein Res., 37: 513–520 (1990).

**[0038]** Der für das synthetische Fmoc(ProFlpGly)<sub>10</sub>-OH verwendete Syntheseweg wird in [Fig. 3](#) gezeigt. In Kürze, kommerzielles Z-Chlortritylharz wurde mit Piperidin entschützt (Barlos et al., Int. J. Pept. Protein Res.,

38: 555–562 (1991)) und mit FmocProFlpGlyOH unter Verwendung von DCC und Hydroxybenzotriazol (HOBT) gekoppelt, um ein an das Harz gebundenes Tripeptid zu erhalten. Die Schritte des Entschützens und Koppelns wurden mit Tripeptideinheiten wiederholt, bis 9 weitere Einheiten hinzugefügt waren. Die resultierende 30-mer-Einheit wurde entschützt und ergab 2 als freie Säure (Tabelle 3). Die 30-mer-Peptide 3 und 4 waren von Peptides International.

Tabelle 3: 30-Mer-Peptide, welche Kollagenstränge imitieren. Tripelhelices, zusammengesetzt aus den Einheiten 2, 3 oder 4 wurden für thermodynamische Messungen der Kollagenstabilität verwendet.

2	$\text{H}_2\text{N}(\text{ProFlpGly})_{10}\text{OH}$ (Erfindung)
3	$\text{H}_2\text{N}(\text{ProProGly})_{10}\text{OH}$ (Vergleichsbeispiel)
4	$\text{H}_2\text{N}(\text{ProHypGly})_{10}\text{OH}$ (Vergleichsbeispiel)

#### Stabilität der Tripelhelix

**[0039]** Die Tripelhelixstruktur von Kollagen weist ein charakteristisches Zirkulardichroismus (CD)-Spektrum mit einem Peaksignal bei 225 nm auf. [Fig. 1](#) zeigt das CD-Spektrum von  $(\text{ProFlpGly})_{10}$  zusammen mit den CD-Spektren von  $(\text{ProProGly})_{10}$  und  $(\text{ProHypGly})_{10}$  (Nebenbild). Jede der drei kollagenähnlichen Verbindungen weist bei 225 nm ein starkes Signal auf, das für die Kollagentripelhelix charakteristisch ist.

**[0040]** Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der durch die Peptide 2–4 gebildeten Helix wurde nach dem Verfahren von Long et al., *Biochemistry*, 32: 11688–11695 (1993) durch Beobachtung des CD-Signals bei 225 nm als eine Funktion der Temperatur bestimmt. Die thermische Denaturierung der drei mit Kollagen verwandten Tripelhelices (80  $\mu\text{M}$ ) wurde in 50 mM Essigsäure durchgeführt, dies ist eine typische Bedingung für die Bewertung der Kollagenstabilität. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die kollagenähnliche Verbindung  $(\text{ProFlpGly})_{10}$  weist eine viel größere thermische Stabilität als  $(\text{ProProGly})_{10}$  und  $(\text{ProHypGly})_{10}$  auf, was mit unserer Hypothese übereinstimmt, dass die Stabilität der Kollagentripelhelices mit dem induktiven Effekt verbunden ist. In Tabelle 4 sind auch die freien Energieänderungen für jede der drei kollagenähnlichen Verbindungen gezeigt. Diese Werte wurden durch das Verfahren von Becktel und Schellman, *Biopolymers* 26: 1859–1877 (1987) erhalten.

Tabelle 4: Fluorprolin stabilisiert Tripelhelixkollagen sehr stark

Strang	$T_m$ (°C)	$\Delta\Delta G_m$ (kcal/mol)
$(\text{ProFlpGly})_{10}$	91	11
$(\text{ProHypGly})_{10}$	69	6,5
$(\text{ProProGly})_{10}$	41	0

Jeder Hyp-Rest:  $6,5 \text{ kcal/mol} \div 30 = 0,2 \text{ kcal/mol}$

Jeder Flp-Rest:  $11 \text{ kcal/mol} \div 30 = 0,4 \text{ kcal/mol}$

**[0041]** Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die elektronenziehende Fähigkeit des Fluoratoms von Flp die Stabilität der Kollagentripelhelix erhöht. Es wird erwartet, dass eine Modifikation der Hydroxylgruppe von Hydroxyprolin im Kollagen, sodass die elektronenziehende Fähigkeit der Hydroxylgruppe zunimmt, eine Zunahme der Stabilität des Kollagens ergibt. Idealerweise sollte die chemische Modifikation: (1) die elektronenziehende Eigenschaft der Hydroxylgruppe verstärken, (2) klein sein, so dass sie das Packen der Tripelhelices aneinander nicht beeinträchtigt, (3) ungeladen sein, so dass sie das Packen der Tripelhelices aneinander nicht beeinträchtigt.

#### Patentansprüche

1. Kollagenähnliche Verbindung, umfassend ein Tripeptid der Formel:  $(\text{Xaa-Flp-Gly})_n$ , worin Xaa ein beliebiger Aminosäurerest, Flp 4(R)-Fluorprolin und n eine positive ganze Zahl ist.

2. Peptid nach Anspruch 1, worin n mindestens 7 ist.

3. Peptid nach Anspruch 1, worin mindestens ein Aminosäurerest Xaa ein Prolinrest ist.

4. Zusammensetzung, umfassend eine Tripelhelix aus kollagenähnlichen Molekülen, worin jedes der Moleküle in der Helix Tripeptide der Formel  $(\text{Xaa-Flp-Gly})_n$  umfasst, worin Xaa eine beliebige natürlich vorkommende Aminosäure,

Flp 4(R)-Fluorprolin und  
n eine positive ganze Zahl ist.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, worin n mindestens 7 ist.
6. Zusammensetzung nach Anspruch 4, worin Xaa Prolin ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

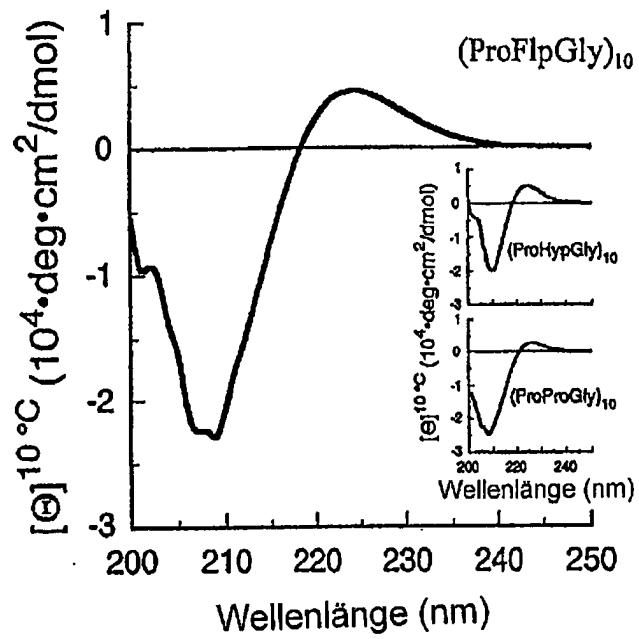


FIG.1

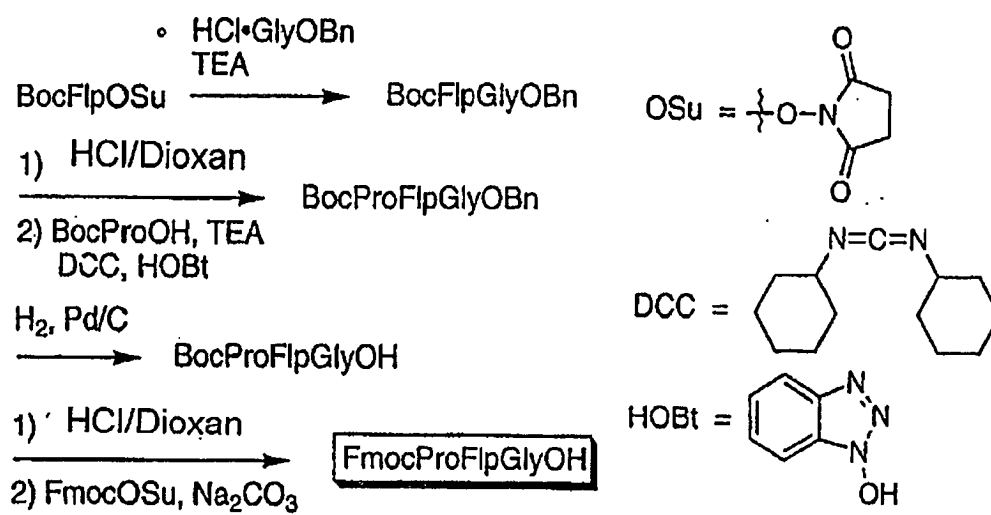


FIG 2

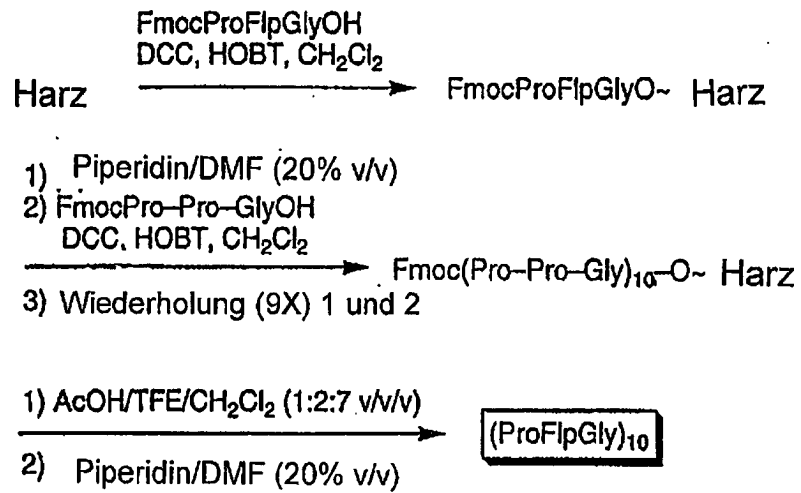


FIG 3